T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

LABADA (*Rumex patientia* L.) EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN VE FİTOKİMYASAL PROFİLİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Derya ALTINTAŞ

Referans no: 10149268

EDİRNE-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

LABADA (*Rumex patientia* L.) EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN VE FİTOKİMYASAL PROFİLİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Derya ALTINTAŞ

Destekleyen Kurum:

Tez no:

EDİRNE-2019

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Derya ALTINTAŞ tarafından tez başlığı "Labada (*Rumex patientia* L.) ekstraktlarının *in vitro* yöntemlerle antioksidan aktivitesinin ve fitokimyasal profilinin değerlendirilmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 26/04/2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU

JÜRİ BAŞKANI (Danışman)

İmza

Doç. Dr. Lokman AYAZ

JÜRİ ÜYESİ

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Gülcan ARUSOĞLU

JÜRİ ÜYESİ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tezimin planlanması ve yürütülmesinde her zaman yanımda olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yeşim YEŞİLOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarım ve analizleri birlikte yürüttüğümüz BURHAN CEYLAN'a, analizlerdeki yardımlarından dolayı TÜTAGEM ve NABİLTEM birimine, beni her zaman içtenlikle destekleyip bugünlere gelmemdeki en büyük etken olan sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLERİ **2**

SERBEST RADİKALLER **2**

ANTİOKSİDANLAR **5**

GEREÇ VE YÖNTEM **14**

BULGULAR **27**

TARTIŞMA **64**

SONUÇLAR **72**

ÖZET **75**

SUMMARY **77**

KAYNAKLAR **79**

ŞEKİLLER LİSTESİ **84**

ÖZGEÇMİŞ **88**

SİMGE VE KISALTMALAR

ABAP:	2,2’-azobis (2-amidinopropan) hidroklorit
ABTS:	2,2’-Azinobis (3-etilbenzentiazolin-6-sülfonat)
APPH:	2,2’-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorit
ATP:	Adenozin tri fosfat
BHA:	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT:	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
CAT:	Katalaz
DPPH:	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
FCR:	Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP:	Demir (II) iyonu indirgeme gücü
FTC:	Ferrik tiyosiyanat
GAE:	Gallik asit eşdeğeri
GSH:	Glutatyon
GSH-Px:	Glutatyon peroksidaz
GSH-Red:	Glutatyon redüktaz
GSSG:	Okside glutatyon
HEM:	Hemoglobin
KS:	Kuru labada su ekstraktı
KM:	Kuru labada metanol ekstraktı
NADPH:	Nikotinamidadenindinükleotid fosfat

NAS:	N-asetil sistein
NBT:	Nitrotetrazolium blue klorür
ORAC:	Oksijen radikalini absorplama kapasitesi
PKE:	Pirokateşol eşdeğeri
PMS:	Fenazin metasülfat
RNS:	Reaktif nitrojen türleri
ROT:	Reaktif oksijen türleri
RSS:	Reaktif sülfür türleri
SOD:	Süperoksit dismutaz
SR:	Serbest radikal
TBHQ:	t-bütil hidroksikinon
TEAC:	Trolox ekivalenti antioksidan kapasitesi
TPC:	Toplam fenolik madde
TRAP:	Toplam radikal tutma parametresi
Trolox:	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilikasit
TS:	Taze labada su ekstraktı
TM:	Taze labada metanol ekstraktı
QUE:	Quersetin eşdeğeri
XOD:	Ksantinoksidaz

GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest radikaller (SR) eşleşmemiş elektrona sahip moleküllerdir. Bu eşleşmemiş elektronlar en dış enerji yörüngesinde bulunur ve reaktiflik özellikleri vardır. Serbest radikallerin neden olduğu hasara oksidatif stres denir. Bu hasarı önleyen maddeler antioksidan olarak tanımlanır (1).

Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin aktivasyonunu engellerler. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) canlı vücudunda artışı hücresel hasarın ana nedeni olarak bilinir. Kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklarda da rol oynarlar (2).

Canlı vücudunda serbest radikallerin üretimi sonucu lipid peroksidasyonu meydana gelir. Biyolojik sistemler serbest radikalleri nötralize etmek, hücreleri zararlı etkilerden korumak için yeterince etkili ve yüksek oranda koruyucu antioksidan sistemler ile donatılmıştır (3).

Çalışmamızda labada yapraklarının su ve metanol ekstraktlarının SR giderme ve antioksidan aktiviteleri farklı metotlar kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için ekstraktların toplam fenolik bileşik ve toplam flavonoid içeriği, klorofil ve karotenoid içerikleri, toplam ferrik iyonlarını indirgeme kapasitesi, H_2O_2 giderme aktivitesi, fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesi, $ABTS^{\bullet+}$ (2,2-Azinobis(3-etilbenzentiazolin-6-sülfonat)) ve DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali giderme aktivitesi, Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi, ferrik tiyosiyanat metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, CUPRAC metodu, hidroksil radikalini temizleme özelliği ve LC-MS/MS ile fenolik madde içeriği tayin edilmiştir. Sonuçlar standart olarak kullanılan kateşol, askorbik asit, gallik asit, kuersetin, α-tokoferol, BHA (Bütillendirilmiş hidroksianisol), BHT (Bütillendirilmiş hidroksitoluen) gibi antioksidan maddeler ve literatür verileriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller; bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip atom ya da moleküllerdir. Bu eşleşmemiş elektronlar molekülün en dış enerji düzeyinde bulunmaktadır. Yapıları kararsız olmakla beraber, reaktiflik özellikleri de fazladır (4).

Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral halde bulunabilirler (5). Eşleşmemiş elektron; atom veya molekülün üst kısmına bir nokta konularak gösterilir (X•).

Serbest radikaller 3 farklı yol ile meydana gelirler (6);

1) Kovalent bağlarda homolitik kırılma ile:

$$X\text{-}Y \rightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$$

2) Molekülün elektron kaybetmesiyle:

$$A \rightarrow A^{\bullet} + e^{-}$$

3) Moleküle elektron transferi ile:

$$A + e^{-} \rightarrow A^{\bullet -}$$

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijen üreten radikaller, ROT oluşturur. Hücre içinde mitokondri tarafından üretilen ürünlerdir. Aynı zamanda enerji üretim mekanizmalarında bir yan ürün olarak ortaya çıkarlar. Biyolojik sistemlerde protein, RNA, DNA ve birçok molekül gruplarıyla tepkimeye girerek zarar verirler (7). Girdikleri tepkimeler sonucunda serbest radikal türlerini oluştururlar (Tablo 1).

Tablo 1. Serbest radikal türleri

Radikalin Adı	**Formülü**	**Özelliği**
Hidrojen radikali	H•	Radikal çeşitlerinin bilinen en basit örneğidir.
Süperoksit radikali	$O_2•^-$	Oksijen metabolizmasında ilk üründür.
Hidroksil radikali	HO•	En çok reaktif olan oksijen radikalidir.
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Moleküler hasar yeteneği ve reaktifliği en düşüktür.
Perhidroksi radikali	$HO_2•$	Lipid peroksidasyonunu hızlandırır.
Azotdioksit	$NO_2•$	Sigara dumanında bulunur.
Alkoksil	RO•	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşur.

Süperoksit radikali ($O_2•^-$)

Moleküler oksijenin bir elektron alması sonucu indirgenmesiyle oluşur.

$$O_2 + \bar{e} \rightarrow O_2•^-$$

Geçiş metallerinin otooksidasyonu, ksantin oksidaz enziminin ksantine etki etmesi ve hemoglobinin parçalanması ile oluşan hematoporfirinin fotoaktivasyonu sonucunda süperoksit anyonu oluşur (8).

Hidroksil radikali (HO•)

Hidroksil radikali, Harber Weiss ve Fenton reaksiyonu sonucunda oluşur. Fenton reaksiyonu hidrojen peroksidin demir ve diğer geçiş metalleri varlığında indirgenmesidir. Harber Weiss reaksiyonu ise süperoksidin hidrojen peroksitle reaksiyonudur (9). Proteinler ve lipidler ile DNA da hasara neden olmaktadır (10).

1) $O_2•^- + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$

2) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH• + O\bar{H}$ (**Fenton reaksiyonu**)

3) $O_2•^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH•$ (**Harber-Weiss reaksiyonu**)

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Biyolojik membranlarda süperoksit anyonunun dismutasyonu sonucu ve moleküler oksijenin iki elektron alması veya $O_2•^-$ bir elektron alması ile H_2O_2 radikali oluşur (9).

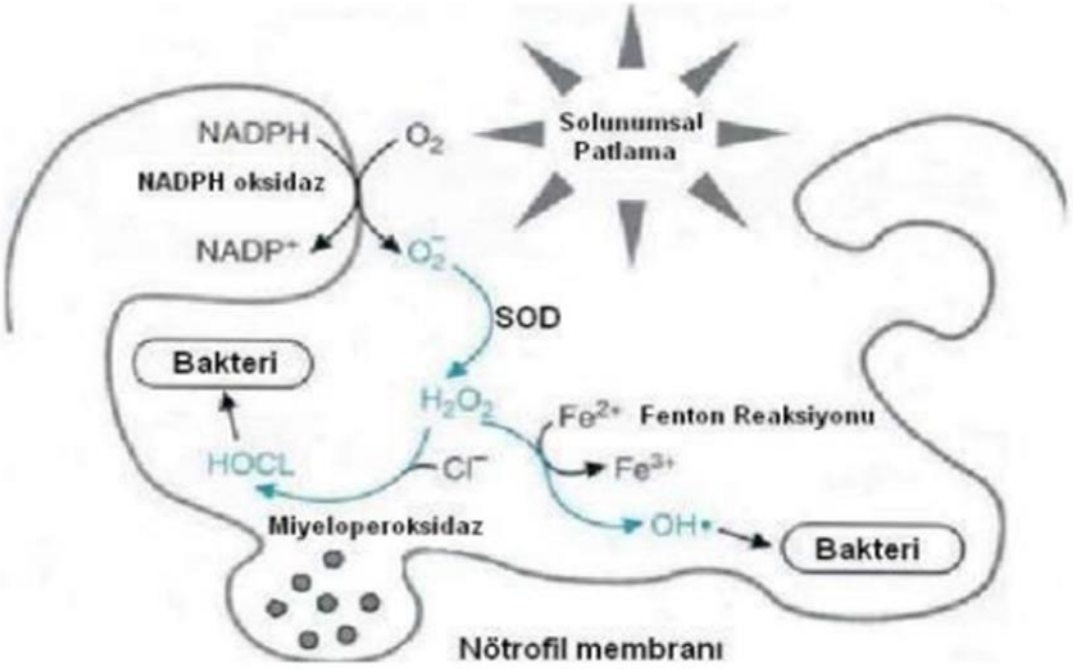
$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$
$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

H_2O_2 bir radikal olarak kabul edilmemesine rağmen, reaktif oksijen türleri içinde yer alır. HEM proteinlerinin yapısını bozarak hasara neden olur (11).

Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Serbest radikallerin hücre içi kaynakları

Serbest radikallerin hücre içindeki kaynakları; mitokondriyal elektron transport zinciri, oksidatif stres, peroksizomlar, plazma membranı, oksidan enzimler, endojenik bileşiklerde otooksidasyon, geçiş metallerinin yer aldığı yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarıdır (12). Solunumsal patlama da bir hücre içi kaynak olarak gösterilebilir (Şekil 1).



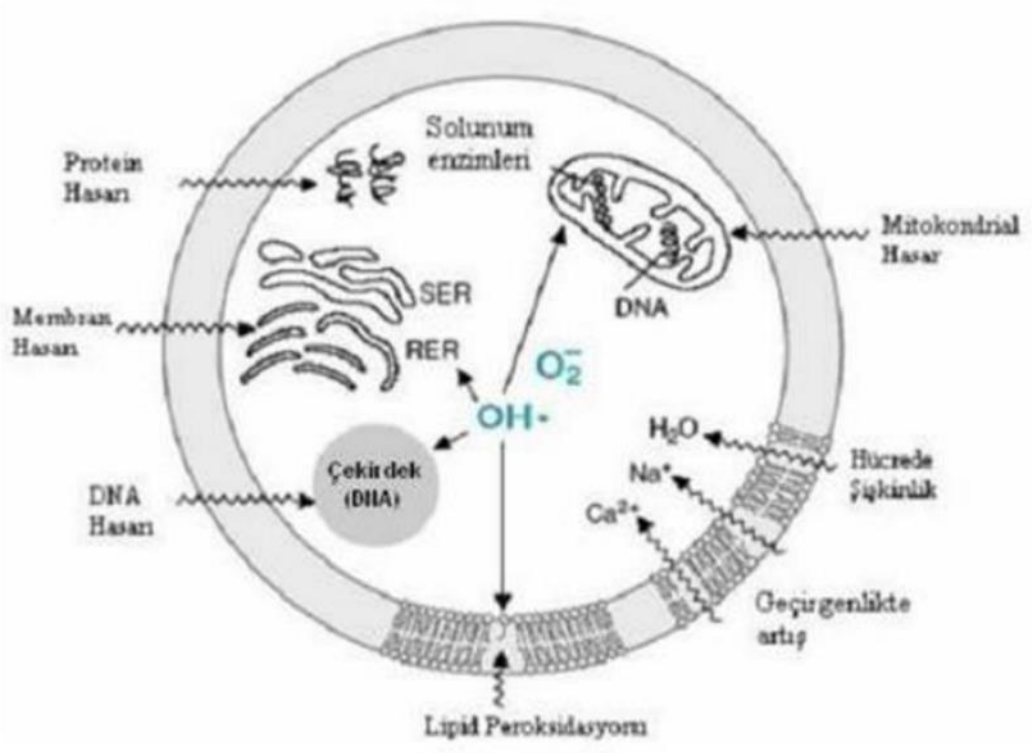
Şekil 1. Solunumsal patlama ile serbest radikal oluşumu (12)

Serbest radikallerin hücre dışı kaynakları

Serbest radikallerin hücre dışındaki kaynakları; ilaçlar, radyasyon, X ışını, UV, ozon, sigara, stres, egzoz dumanları ve bağımlılık yapan maddelerdir (12).

Serbest Radikallerin Etkileri

SR artışı ile oksidatif stres, hücre hasarı ve hücre ölümlerine neden olmaktadır (Şekil 2). Metabolizma, doku ve organlarda kanser, diyabet, Alzheimer, Parkinson, Down sendromu, merkezi sinir sistemi hastalıkları, yaşlanma, romatizmal ve kardiyovasküler hastalıklar ile DNA'da gen mutasyonlarına neden olmaktadır (13,3,14).



Şekil 2. Hücrede serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar (13)

ANTİOKSİDANLAR

Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı engellemeye yardımcı bileşiklere **''antioksidanlar''** denir. Antioksidanlar yüksek oranda koruyucu sistemlerdir. Serbest radikallere bastırıcı, toplayıcı, kırıcı ve onarıcı etki gösterirler (5).

Bastırıcı etki, radikallerin aktifliğinin azaltılıp, aktif olmayan forma dönüştürülmesidir. Kırıcı etki, serbest radikallerin zincirlerinin kırılması ve fonksiyonlarının engellenmesidir. Toplayıcı etki, oksijen radikallerini toplama ve onları daha zayıf forma dönüştürme etkisidir. Onarıcı etki ise serbest radikallerin oluşturduğu hasarın onarılmasıdır (5).

Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar; enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere 2 sınıfa ayrılır;

Enzimatik antioksidanlar, enzim yapısındaki antioksidanlardır. Bunlar glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), mitokondriyal sitokrom oksidaz ve peroksiredoksinlerdir. Enzimatik olmayan antioksidanlar; melatonin, bilirubin, ürik asit, metal iyonunu bağlayan proteinlerdir (15).

Enzimatik antioksidanlar

1-Süperoksit dismutaz (SOD) (Süperoksit Oksidoredüktaz, EC: 1.15.1.1): Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalini hidrojen peroksit molekülüne dönüştürür. Hidrojen peroksit ise katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından yok edilir (16).

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

2-Katalaz (CAT) (H_2O_2 Oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.6): Bilinen en etkin enzimlerden olup, 4 alt birimden oluşur. HEM grubu içeren katalaz enzimi peroksizomlarda bulunur. Biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 molekülünü su ve moleküler oksijene parçalar (17,18).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

3-Glutatyon peroksidaz (GPx) (H_2O_2 Oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.9): Oksidatif strese karşı koruyucu olan enzimin iki farklı formu bulunur; selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz ve selenyum bağımsız glutatyon-S-transferaz. Düşük konsantrasyonlarda glutatyon peroksidaz H_2O_2 molekülünü suya parçalar (19).

$$H_2O_2 + 2G\text{-}SH \xrightarrow{GSH-Px} GSSG + 2H_2O$$

4-Glutatyon redüktaz (GSH-Red) (EC: 1.8.1.7): Glutatyon redüktaz yükseltgenmiş glutatyonu indirgenmiş hale çevirir. Bu reaksiyon sırasında elektronların NADPH'tan FAD'a transferi gerçekleşir.

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

NADPH 'ın kaynağı pentoz fosfat yoludur (6).

5-Glutatyon-S-transferaz (GST) (EC: 2.5.1.18): Dokuları oksidatif hasara karşı korumada, antioksidan savunma mekanizması oluşturması açısından hayati önemi vardır (20).

$$ROOH + 2G\text{-}SH \xrightarrow{GST} GSSG + ROH + H_2O$$

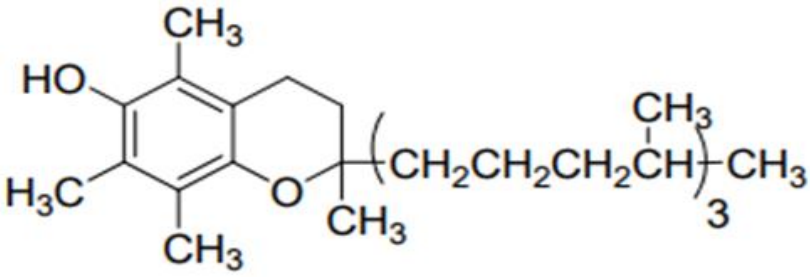
6-Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinde en son enzim olarak görev alan mitokondriyal sitokrom oksidaz süperoksit molekülünü suya dönüştürür.

$$4O_2^{\bullet -} + 4H^+ + 4\bar{e} \rightarrow 2H_2O$$

7-Peroksiredoksinler: Oksidatif hasara karşı vücudu savunmada görevli olan peroksiredoksinler antioksidan proteinlerdir.

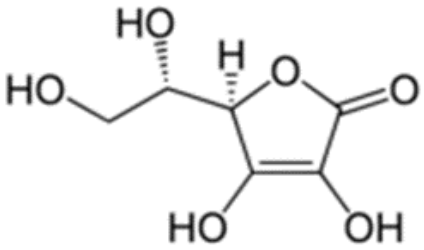
Ezimatik olmayan antioksidanlar

1-α-tokoferol (E vitamini): Zincir kırıcı antioksidan özelliğe sahip olan E vitamini yağda çözünür ve hücre membranlarında bol miktarda bulunur (Şekil 3). Biyolojik sistemleri lipid peroksidasyonuna karşı koruma yeteneğine sahiptir. En aktif form olan α-tokoferol, oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir (21).



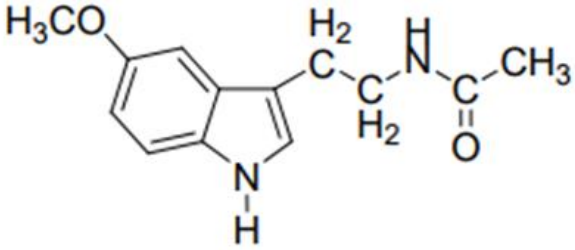
Şekil 3. α-tokoferolün yapısı

2-Askorbik asit (C vitamini): Antioksidan özelliğiyle birlikte birçok hücresel aktiviteye sahiptir (Şekil 4). İnsan vücudunda L-glukolakton oksidaz enzim eksikliğinden dolayı C vitamini üretilememektedir, bu yüzden dışarıdan meyve ve sebze ağırlıklı beslenerek alınır (5).



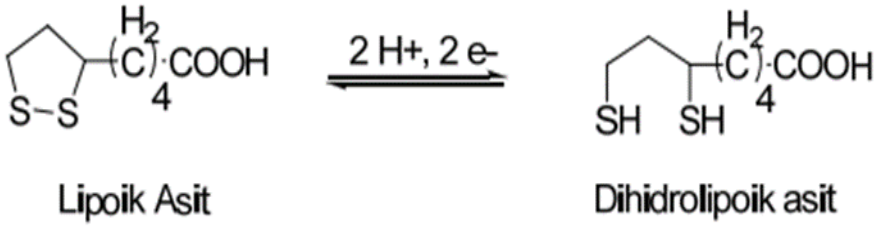
Şekil 4. Askorbik asidin yapısı

3-Melatonin (MLT): En güçlü antioksidanlardan biri olarak bilinen melatonin aynı zamanda bir hormondur (Şekil 5). Oksidatif hasara karşı hücreyi korumada görev alır (22).



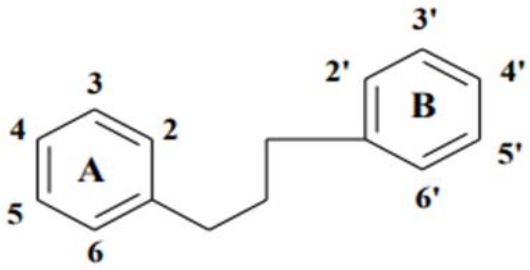
Şekil 5. Melatonin yapısı

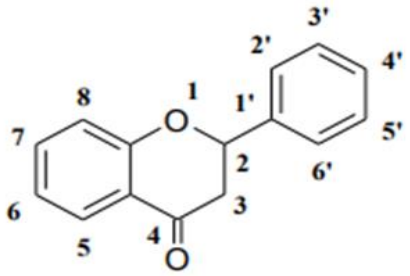
4-Lipoik asit: Proteinlerin oksidatif hasarını önlemede görev alan lipoik asit, OH radikalini ve H_2O_2 molekülünü nötralize eder (Şekil 6).



Şekil 6. Lipoik asidin dihidrolipoik aside indirgenme reaksiyonu

5-Flavonoidler: Flavonoidler polifenolik bileşiklerdir. İnsan sağlığı üzerine faydalı olan bu bileşikler insan vücudunda sentezlenemezler. Yapıları difenil propan (C_6-C_3-C_6) karbon iskeleti üzerine karakterize edilmiştir (Şekil 7).





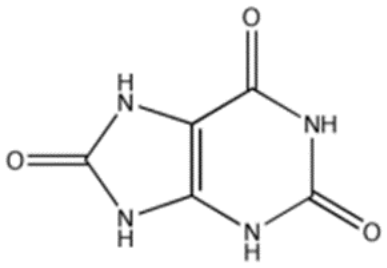
C_6-C_3-C_6 sistemi

Flavonoidlerin genel yapısı

Şekil 7. C_6-C_3-C_6 sistemi ve flavonoidlerin genel yapısı

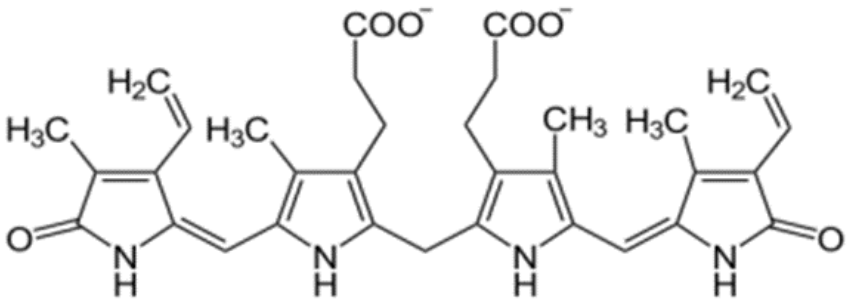
Flavonoidler reaktif oksijen ve azot türlerini temizleme, Fe ve Cu iyonlarını şelatlama ve aynı zamanda lipid peroksidasyonunu önleme yeteneğine sahiptirler (23).

6-Ürik asit: Pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asit, serbest radikal temizleyicisidir (Şekil 8). Metal iyonlarını bağlayıcı özelliğe sahiptir (24).



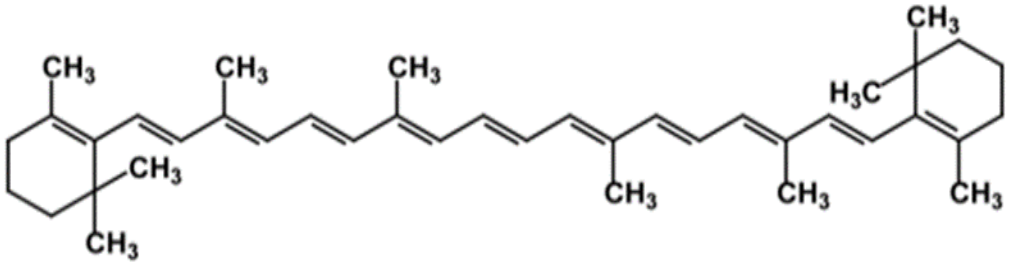
Şekil 8. Ürik asit yapısı

7-Bilirubin: HEM metabolizmasının son ürünüdür (Şekil 9). Bilirubin, lipid peroksidasyonunda antioksidan olarak görev yapar (25).



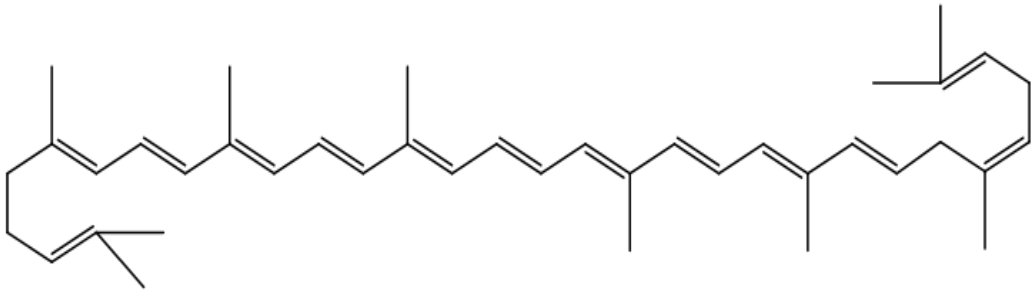
Şekil 9. Bilirubin yapısı

8-Karotenoidler: Bitkilerde sentezlenebilen doğal pigmentlerdir (Şekil 10). Peroksil radikallerini ve singlet oksijeni temizleyebilen etkili antioksidanlardandır. En bilinenleri A vitamini öncüsü olarak görev yapan β-karoten ve likopendir (4).



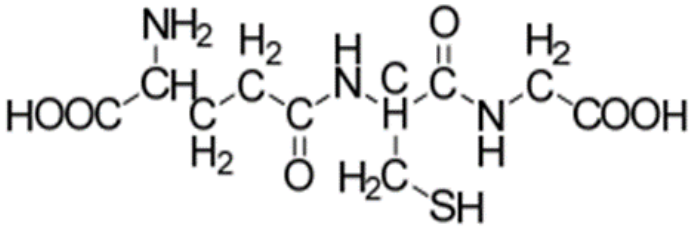
Şekil 10. β-karoten yapısı

Likopen, NO_2 ve H_2O_2 moleküllerini nötral hale getiririr (Şekil 11).



Şekil 11. Likopen yapısı

9-Glutatyon: Tripeptit yapısında olan glutatyon suda çözünme yeteneğine sahip güçlü bir antioksidandır (Şekil 12). Serbest radikalleri indirgeyerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. En önemli özelliği eritrositleri H_2O_2 molekülünden koruması ve hemoglobinin tiyol grubunu indirgenmiş halde tutarak oksidatif hasarı önlemesidir (20).



Şekil 12. Glutatyon yapısı

Metal iyonlarını bağlayan proteinler

Metal iyonlarını bağlamada görev alan proteinler; albümin, ferritin, transferrin ve seruloplazmindir (26,27).

1-Albümin: Bakır iyonunu bağlama yeteneğine sahiptir. Hidroksil radikali oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu engeller.

2-Ferritin: Demir iyonunu bağlama ve depolama yeteneğine sahiptir.

3-Transferrin: Dolaşım sistemindeki serbest demir iyonlarını bağlar.

4-Seruloplazmin: Plazmada bakırı bağlama yeteneğine sahiptir. Fe^{+2} iyonunu Fe^{+3} iyonuna yükseltger.

Fitokimyasallar ve Sınıflandırılması

Tüm bitkiler metabolik aktiviteleri için kimyasal bileşenler üretmektedir. Bu kimyasallara fitokimyasal denir ve ikiye ayrılır;

1-Birincil metobolitler: Şeker ve yağlardır.

2-İkincil metobolitler: Toksinler ve feromonlardır.

Bitkinin üreme ve kendini koruma amacıyla ürettiği kimyasallar tedavi amaçlı kullanılabilmektedir. Bunlardan elde edilen bazı ilaçlar, inulin, kinin, morfin, kodein, digoksindir (20).

Flavonoidler ve fitokimyasal etkileri

Flavonoidler insan besin zincirinde yer alan ve bitkilerde bulunan kimyasallardır. Anti-alerjik, anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-kanser ve antidiyaretik etki göstermektedir. Flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri C ve E vitamini ile karşılaştırıldığında onlardan daha fazla aktiviteye sahip oldukları görülmektedir (28).

Flavonoidlerin topoizomeraz enzimini inhibe ederek DNA mutasyonunu engelledikleri ve akut lösemi için etkili oldukları bilinmektedir. Ayrıca kemotropik anti kanser ilaçlarına benzer şekilde etkileri de bulunmaktadır.

Flavonoid açısından zengin besinlerin zihinsel fonksiyonlar üzerine etkileri de önemli bir husustur. Flavonoidler Alzheimer hastalığı üzerine geri dönüştürücü ve engelleyici etkilere sahiptirler.

Nörolojik proteinler ile etkileşerek nöronların iletim yollarında etki göstermektedirler. Sinir sistemi bozuklukları, nöron hücrelerinin ölümünün durdurulması ve damarlardaki kan akışının kapiler geçirgenliğinin arttırılması yine flavonoidler sayesinde olmaktadır (28).

Çalışmada Kullanılan Bitki ve Genel Özellikleri

Rumex (labada) L. cinsi sütotugiller (polygalaceae) familyasında yer almaktadır. Ilıman ve tropik bölgelerde yayılış gösteren bu familya, otsu, çalı ve küçük ağaç formunda bitkilerdir. 12 cinse ait 750 tür içeren familya süs bitkisi olarak ekonomik değere sahiptir (28).

Ülkemizde yetişen labada (rumex) farklı yörelerde evelik, develik, efelik gibi isimlerle de anılmaktadır. Ekşi olmayan türlerin yaprakları Anadolu'da evelik diye anılırken, ekşi yapraklı türleri kuzukulağı adıyla anılır.

Rumex patientia L. türü genel olarak çok yıllık 2 metreye kadar boylanabilen otsu bir bitkidir (Şekil 13).



Şekil 13. Labada (*Rumex patientia* L.) yaprakları

Dünya genelinde 200 farklı *Rumex* türü bulunmaktadır. Türkiye'de ise 25 türü bulunur ve 5 farklı hibrite sahiptir. Bunlardan en yaygın olanı *Rumex patientia* L'dır. Bahçe labadası olarak da bilinir. (29,30).

Yaprakları sarmal dizilimli, bazı yaprakları ise yumurta şeklinde ve küt uçludur. Mayıs-Eylül aylarında çiçek açar, yamaç, tarla ve yol kenarlarında bulunur. Labada yaprakları antiradikal özellik göstermektedir. Kökleri antrakinon glikozitleri, emodin-6-O-glukopiranozit, flavonol, 6-klorokateşin gibi birçok fenolik bileşik içerir (28).

Labada yaprakları alternatif tıpta oldukça kullanılmaktadır. Laksatif, diüretik, antipiretik ve anti-inflamatuar özellik göstermektedir. Antrokinon türevleri osteoartrit tedavisinde etkilidir. Ayrıca kronik sinüzit hastalığına karşı da kullanılmaktadır.

Fitokimyasal profili değerlendirildiğinde labadanın, antrokinonlar, tanninler ve naftalen türevlerince zengin olduğu görülmüştür. Yapraklarından izole edilen bileşikler; rumeksozid, labadozid ve oryantaloziddir. 1,5-dihidroksi-3-metil antrokinon, 1,3,5-trihidroksi-6-hidroksimetil antrokinon, 1,5-dihidroksi-3-metoksi-7-metil antrokinondur (31).

Labada yapraklarının rutin, hiperozid, kuersitrin, kuersetin-3-0-glukoronid, avikularin, viteksin, orientin türevleri gibi flavonidler, krizofenol, 8-O-glukozidi, okzalik asit, flavon-3-ol, kateşin, epikateşin, gallik asit, p-kumarik asit gibi fenolik asitler içerdiği bildirilmiştir (30).

Bu tez çalışmasında labada yapraklarının antioksidan özelliğine sahip olup olmadığı çeşitli metodlar kullanılarak incelenmiştir. Toplam fenolik bileşik ve toplam flavonoid içeriği, klorofil ve karotenoid içerikleri, toplam ferrik iyonlarını indirgeme kapasitesi, H_2O_2 giderme aktivitesi, fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesi, $ABTS^{\bullet+}$ (2,2-Azinobis(3-etilbenzentiazolin-6-sülfonat)) ve DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali giderme aktivitesi, Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi, ferrik tiyosiyanat metodu ile toplam antioksidan aktivitesi, CUPRAC metodu, hidroksil radikalini temizleme özelliği ve LC-MS/MS ile fenolik madde içeriği kullanılan metotlardır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇ

Bitki Örnekleri

Deneyde kullanılan bitkisel materyal labada, Kırklareli ilinin Babaeski ilçesine bağlı olan Müsellim köyünden toplandı. Bitkinin yaprak kısımları saplarından ayrıldıktan sonra bir kısmı derin dondurucuda bekletildi. Diğer kısmı ise güneş almayan bir yerde oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Ardından kurumuş yapraklar öğütülerek toz haline getirildi.

Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich ve Merck firmasından satın alındı. Çalışmalarda analitik terazi (Presica X13 220A), çalkalamalı su banyosu (Clifton 100-400 rpm; termostatlı), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), pH-metre (WTW pH 3L5i), santrifüj (MSE Mistral 2000), soğutmalı santrifüj (Hettich 38 R), LC-MS/MS (Agilent Technologies 6420 Triple Quad), mikro pipetler ve eppondorflar kullanılan ekipmanlardır.

Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

% 2'lik Na_2CO_3 Çözeltisi: 2 g Na_2CO_3 tartılarak destile su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

Folin-Ciocalteau Reaktifi: Sigma-Aldrich firmasından alındığı şekilde kullanıldı.

% 5'lik Sodyum Nitrit Çözeltisi: 5 g $NaNO_2$ tartılarak balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk $Al(NO_3)_3.9H_2O$ Çözeltisi: 10 g $Al(NO_3)_3.9H_2O$ tartılarak balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 4.3'lük NaOH Çözeltisi: 4.3 g NaOH tartılarak balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.1 M Fosfat Tamponu (pH=7.4): KH_2PO_4 (13.609 g/L) ve Na_2HPO_4 (14.196 g/L) çözeltilerinin pH= 7.4 olacak şekilde (yaklaşık 60/225 mL oranında) karıştırılması ile hazırlandı.

40 mM H_2O_2 Çözeltisi: 0.409 mL H_2O_2 alınarak balon jojede 0.1 M fosfat tamponu (pH=7.4) ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M Fosfat Tamponu (pH=6.6): KH_2PO_4 (27.218 g/L) ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ (35.598 g/L) çözeltilerinin pH=6.6 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

1 mM DPPH Çözeltisi: 0.01972 g DPPH tartılarak etanolde çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı. (Günlük hazırlanır ve ışıktan korunur.)

% 1'lik $K_3Fe(CN)_6$ Çözeltisi: 1 g $K_3Fe(CN)_6$ tartılarak balon jojede destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk TCA Çözeltisi: 10 g Trikloroasetik asit tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 0.1'lik $FeCl_3$ Çözeltisi: 0.1666 g $FeCl_3.6H_2O$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

2 mM $FeCl_2$ Çözeltisi: 0.0398 g $FeCl_2.4H_2O$ tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

5 mM Ferrozin Çözeltisi: 0.0616 g Ferrozin tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 25 mL'ye tamamlandı.

156 µM NBT (Nitrotetrazoliumblue klorür) Çözeltisi: 0.0128 g NBT tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

468 µM NADH (Nikotin amid adenin di nükleotid) Çözeltisi: 0.0332 g NADH tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

60 µM PMS (Phenozinemetha sülfat) Çözeltisi: 0.0018 g PMS tartılarak 0.1 M fosfat tamponunda (pH=7.4) çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

4 mM Amonyum Molibdat Çözeltisi: 0.2964 g Amonyum molibdat tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 60 mL'ye tamamlandı.

28 mM Sodyum Fosfat Çözeltisi: 0.2754 g Sodyum fosfat tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 60 mL'ye tamamlandı.

0.6 M Sülfürik Asit Çözeltisi: 1.9 mL der. H_2SO_4 (18.76 M) çözeltisinden alınarak içinde bir miktar destile su bulunan 60 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve destile su ile tamamlandı.

Fosfomolibden Metodu Belirteç Çözeltisi: Eşit miktarlarda alınan amonyum molibdat, sodyum fosfat ve sülfürik asit çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlandı.

% 80'lik Aseton Çözeltisi: 40 mL saf aseton alınarak destile su ile balon jojede 50 mL'ye tamamlandı.

7 mM ABTS Çözeltisi: 8 mg ABTS tartılıp 1 mL suda çözüldü. 13.2 mg potasyum persülfat tartılıp 10 mL suda çözüldü. Çözeltilerden 0.5'er mL karıştırıldı ve 12-16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. ABTS çözeltisi kullanılmadan önce absorbansı 734 nm'de 0.7 ± 0.025 olacak şekilde 0.1 M fosfat tamponuyla (pH=7.4) seyreltildi.

% 4'lük Vanilin-Metanol Çözeltisi: 2 g vanilin tartılıp 50 mL'ye metanolle tamamlandı.

0.04 M Fosfat Tamponu (pH=7): KH_2PO_4 (5.44 g/L) ve Na_2PO_4 (5.68 g/L) çözeltileri pH=7 olacak şekilde karıştırıldı.

Linoleik Asit Emülsiyonu: 175 mg Tween-20 ve 155 µL linoleik asidi fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlayarak hazırlandı.

% 75'lik Etanol Çözeltisi: 375 mL saf etil alkol alınarak destile su ile balon jojede 500 mL'ye seyreltildi.

% 30'luk NH_4SCN Çözeltisi: 30 g NH_4SCN tartılarak destile suda çözüldü, balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 3.5'luk HCl Çözeltisi: 9.46 mL der. HCl (%37'lik) çözeltisinden pipetle alınarak içinde bir miktar destile su bulunan 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve destile su ile tamamlandı.

20 mM $FeCl_2$ Çözeltisi: 0.398 g $FeCl_2.4H_2O$ tartılarak %3.5'luk HCl ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M Fosfat Tamponu (pH=7.4): KH_2PO_4 (27.218 g/L) ve $Na_2HPO_4.2H_2O$ (35.598 g/L) çözeltilerinin pH=7.4 olcak şekilde karıştırılması ile hazırlandı.

10 mM 2-deoksiriboz Çözeltisi: 0.1341 g 2-deoksiriboz tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM $FeSO_4$-EDTA Çözeltisi: 0.5702 g $FeSO_4$-EDTA tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM H_2O_2 Çözeltisi: 0.102 mL H_2O_2 alınarak balon jojede 0.1 M fosfat tamponu (pH=7) ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 2.8'lik TCA Çözeltisi: 2.8 g Trikloro asetik asit tartılarak destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

50 mM NaOH Çözeltisi: 0.2 g NaOH tartılıp destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

% 1'lik TBA Çözeltisi: 1 g tiyobarbütirik asit tartılıp destile suda çözüldü ve balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

10^{-2} M $CuCl_2$ Çözeltisi: $CuCl_2.2H_2O$'den 0.4262 g tartılarak destile su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Amonyum asetat tamponu: 1 M (pH=7), NH_4Ac'den 19.27 g tartılarak destile su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Neokuproin çözeltisi: 7.5×10^{-3} M, neokuproin (2.9 dimetil 1-10 fenantrolin)'den 0.039 g tartılarak %96'lık etil alkol ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

KULLANILAN YÖNTEMLER

Ekstraktların Hazırlanışı

Kurutulan labada yaprakları ile derin dondurucudan alınan yapraklar, blender yardımıyla homojenize hale getirildikten sonra metanol ve su çözücüleri kullanılarak ekstraktlar hazırlandı.

Su ekstraksiyonu için 25'er gr taze ve kuru yaprak 500 mL suda 40 ^{o}C'ye ısıtılarak 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Elde edilen su ekstraktları süzgeç kağıdından süzüldü ve süzüntü liyofilize edildi.

Metanol ekstraksiyonu için 25'er g taze ve kuru yaprak 500 mL çözücü içinde oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosunda 100-150 rpm'de 3 saat inkübe edildi. Elde edilen ekstraktlar, süzgeç kağıdından süzüldü ve süzüntülerin çözücüleri evaporatörde 40 ^{o}C'de uçuruldu.

Ekstrelerin susuz kalıntıları 0.001 g'lık porsiyonlara ayrılarak eppendorflara konuldu ve analizlerde kullanılıncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

Toplam Fenolik Bileşik Tayini (TPC)

Labada (*Rumex patientia* L.) yapraklarının taze ve kuru örneklerinin su ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde içerikleri Slinkard ve Singleton tarafından modifiye edilen Folin-Ciocalteu metoduna (FCR) göre belirlenmiştir (32). FC reaktifi fosfotungustik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerinin karışımı olup fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile doğru orantılı olup 760 nm'de spektrofotometrede takip edilir.

Bitkilerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su ve metanol ekstraktlarından 1mL alındı. Destile suyla hacimler 46 mL'ye tamamlandıktan sonra 1 mL Folin belirteci eklendi. 3 dakika sonra % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 3 mL katılarak oda şartlarında 2 saat çalkamalı su banyosunda 150 rpm'de tutuldu. Örnek yerine destile su içeren şahit denemeye karşı, 760 nm'de absorbans ölçüldü.

50-250 µg/mL olacak şekilde hazırlanan standartlar (gallik asit ve pirokateşol) için de aynı deneme yapıldı. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden örneklerin toplam fenolik madde miktarları mg olarak hesaplandı.

Toplam Flavonoid İçeriğinin Tayini

Bitkilerin su ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid madde içeriği Zhishen ve arkadaşlarının uygulamış olduğu metoda göre belirlendi (33).

Bitkilerin 1000 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan su ve metanol ekstraktlarından 10 mL alındı. Üzerine 1 mL %5'lik sodyum nitrit ilave edilerek 6 dk bekletildi ve flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturmak için 1 mL %10'luk alüminyum nitrat eklendi. 6 dk sonra 10 mL %4.3'lük NaOH ilave edildi ve toplam hacim destile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 15 dk sonra son çözelti iyice karıştırıldı ve 510 nm'de şahite karşı absorbansı ölçüldü.

Standart olarak kullanılan gallik asit ve kuersetin için de aynı denemeler yapıldı. Okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafiklerin denklemlerinden, örneklerin toplam flavonoid madde miktarları mg gallik asit/g taze ekstrakt, mg gallik asit/g kuru ekstrakt ve mg kuersetin/g taze ekstrakt, mg kuersetin/g kuru ekstrakt olarak tanımlandı.

Demir (II) İyonlarını Şelatlama Aktivitesinin Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki yaprak ekstraktlarının Fe^{2+} iyonlarını şelatlama aktivitesi Oyaizu ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (34). Metod, Fe^{2+} iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Şelatlama gücü yüksekse kırmızı renki Fe^{2+}/ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir.

0.4 mL yaprak örneğine 0.05 mL 2 mM $FeCl_2$ çözeltisi eklendi. Reaksiyon 0.2 mL 5mM Ferrozin çözeltisi ilave edilerek başlatıldı. Toplam hacim etil alkolle 4 mL'ye ayarlandı. Sonra karışım vorteksle hızlıca karıştırılıp 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.

Bu süre sonunda absorbansları 562 nm'de okundu. Kontrol; ferrozin ve $FeCl_2$ içermektedir. Standart olarak askorbik asit, EDTA, BHA ve BHT kullanıldı. Aşağıdaki denkleme göre % metal şelatlama etkisi değeri hesaplandı.

Metal şelatlama (%): $[(A_{kontrol} - A_{örnek}) / A_{kontrol}] \times 100$

$A_{kontrol}$: Kontrolün absorbansı$A_{örnek}$: Ekstrakt ya da standartların absorbansı

DPPH• Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Serbest radikal yakalama etkinliği deneyi DPPH• (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) radikali kullanılarak Blois'in metoduna göre çalışıldı (35). Metod ekstraktların bir proton veya bir elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir.

Yaprak ekstraktları ve standartlar 50-250 μg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. 3 mL 0.1 mM DPPH üzerine farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt ve standart çözeltilerden 1 mL eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda şartlarında karanlıkta 30 dk bekletildi. 517 nm'de absorbansları okundu. Kontrol olarak sadece etil alkol kullanıldı. Standart olarak askorbik asit, BHA, BHT, α-tokoferol kullanıldı. Aşağıdaki denkleme göre % DPPH• yakalama etkisi değerleri hesaplandı.

DPPH• yakalama etkisi (%): $[(A_{kontrol} - A_{örnek}) / A_{kontrol}] \times 100$

$A_{kontrol}$: Kontrolün absorbansı$A_{örnek}$: Ekstrakt ya da standartların absorbansı

H_2O_2 Giderme Aktivitesinin Tayini

Yaprak ekstraktlarının H_2O_2 giderme aktivitesinin tayini Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (36). Reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki hidrojen peroksit çözeltisinin ekstrakt tarafından yıkılması 230 nm'deki absorbans değişimiyle ölçülür.

3.4 mL fosfat tamponu (100 mM pH=7.4) ve 0.6 mL H_2O_2 çözeltisine (100 mM, pH=7.4 fosfat tamponunda 40 mM) 1 mL ekstrakt ilave edildi. Absorbans 10 dk sonra 230 nm'de okundu. Kontrol; fosfat tamponu (100 mM, pH=7.4) ve H_2O_2 çözeltisi içermektedir. Standart olarak askorbik asit, BHA, BHT ve α-tokoferol kullanıldı.

Yaprak ekstraktları ve standartlar 50-250 μg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Aşağıdaki denkleme göre % H_2O_2 giderme etkisi değerleri hesaplandı.

H_2O_2 giderme etkisi (%): $[(A_{kontrol} - A_{örnek}) / A_{kontrol}] \times 100$

$A_{kontrol}$: Kontrolün absorbansı $A_{örnek:}$ Ekstrakt ya da standartların absorbansı

Toplam Ferrik İyonlarını (Fe^{+3}) İndirgeme Kapasitesinin Tayini

Ekstraktların toplam indirgeme kapasitesi tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı (34). Ortamdaki indirgen madde, Fe^{3+} iyonlarını Fe^{2+} iyonlarına indirger ve $FeCl_3$ ilavesiyle oluşan Prusya mavisi renginde olan kompleksin absorbansı ölçülür. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesidir.

1 mL ekstrakta, 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH=6,6) ve 2,5 mL %1'lik $K_3Fe(CN)_6$ eklendi. Karışım 50 °C'de 20 dk inkübe edildikten sonra 2,5 mL %10'luk TCA ilave edildi ve 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası çözeltinin üst tabakasından 2,5 mL alınarak 2,5 mL destile su ve 0,5 mL %1'lik $FeCl_3$ çözeltisi ile karıştırıldı. 700 nm'de absorbanslar ölçüldü. Standart olarak askorbik asit, BHA, BHT ve α-tokoferol kullanıldı.

Süperoksit Anyon Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Ekstraktların süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesi, nitrobluetetrazolium (NBT) ürünün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi (37). Deney koşullarında NADH/PMS/O_2 sistemi ile üretilen süperoksit radikali sarı renkli olan NBT'yi mavi-mor renkli formazon türevine indirger. Süperoksit radikali giderme aktivitesi olan bileşikler varlığında düşük absorbans değerleri elde edilir.

1 mL 156 μM NBT çözeltisi (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) ve 1 mL 468 μM NADH çözeltisi (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) ve 1 mL ekstrakt veya standartlar karıştırıldı. Karışıma 10 μL 60 μM PMS çözeltisi (0,1 M, pH=7,4 fosfat tamponunda) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı.

Karışım 25 °C'de 5 dk inkübe edildi ve absorbansı 560 nm'de ölçüldü. Standart olarak askorbik asit, BHA ve BHT kullanıldı. Kontrol çözeltisine ekstrakt yerine 1 mL su ilave edilerek aynı işlemler yapıldı. Ekstraktlar ve standartlar 50-250 μg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Aşağıdaki denkleme göre % inhibisyon değerleri hesaplandı.

% inhibisyon: $[(A_{kontrol} - A_{örnek}) / A_{kontrol}] \times 100$

$A_{kontrol}$: Kontrolün absorbansı $A_{örnek}$: Ekstrakt ya da standartların absorbansı

ABTS•$^{+}$ Radikali Giderme Aktivitesinin Tayini

Ekstraktların ABTS•$^{+}$ radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (38).

ABTS•$^{+}$ radikali, 7 mM ABTS çözeltisi ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltisi arasındaki reaksiyonla oluşturuldu. Oda sıcaklığında 12 saat karanlıkta bekletildi. Kullanmadan önce fosfat tamponuyla (0,1 M, pH=7,4) absorbans 734 nm'de 0,7±0.025 olacak şekilde seyreltildi.

3 mL ABTS çözeltisi, 1 mL standart çözeltilerine eklendi. 30 dk sonra 734 nm'de absorbans okundu. Aşağıdaki denkleme göre % inhibisyon değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon: } [(A_{kontrol} - A_{örnek}) / A_{kontrol}] \times 100$$

$A_{kontrol}$: Kontrolün absorbansı $A_{örnek:}$ Ekstrakt ya da standardın absorbansı

Fosfomolibden Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Ekstraktların toplam antioksidan kapasiteleri Prieto ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (39).

Yaprak ekstraktları ve standart çözeltilerin 50-250 µg/mL konsantrasyonlarından 0,4 mL alınıp, amonyum molibdat (4mM), sodyum fosfat (28 mM) ve sülfürik asit (0,6 M) içeren belirteç çözeltisinden 3,6 mL ilave edilerek karıştırıldı. Reaksiyon karışımı su banyosunda 90 °C'de 90 dk inkübe edildi. Soğutulduktan sonra fosfomolibden kompleksinin absorbansı şahite karşı 695 nm'de ölçüldü.

Standart olarak askorbik ve α-tokoferol kullanıldı. Askorbik asit için yapılan denemeden okunan absorbans ile konsantrasyon arasında çizilen grafik denkleminde ekstraktların antioksidan aktiviteleri askorbik asit ekivalenti (mg Askorbik asit/g ekstrakt) olarak ifade edildi.

Hidroksil Radikali Giderme Aktivitesi

Yaprak ekstraktlarının hidroksil radikali giderme aktivitesi Bajpai ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (24).

450 µL 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH=7.4), 150 µL 10 mM 2-deoksiriboz, 150 µL 10 mM $FeSO_4$-EDTA, 525 µL destile su ve 75 µL örnek çözeltisinden (50, 100, 150, 200,

250 µg/mL) ibaret olan reaksiyon karışımına 150 µL 10 mM H_2O_2 ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 37 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra sırasıyla 750 µL %2.8'lik TCA ve 50 mM NaOH'deki %1'lik TBA çözeltisinden 750 µL ilave edildi ve tüpler 10 dk kaynatıldı. Tüpler soğutularak 520 nm'de şahite karşı absorbans değeri okundu. Yaprak çözeltisi yerine destile su içeren reaksiyon karışımı kontrol olarak kullanıldı. Standart olarak BHT (50, 100, 150, 200, 250 µg/mL) kullanıldı.

Hidroksil radikali giderme aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

Hidroksil radikali giderme aktivitesi (%): $[(A_{kontrol} - A_{örnek}) / A_{kontrol}] \times 100$

$A_{kontrol}$: Kontrolün absorbansı $A_{örnek:}$ Ekstrakt ya da standartların absorbansı

Bakır İyonlarını İndirgeme Potansiyeli (CUPRAC Metodu)

Yaprak ekstraktlarının bakır iyonlarını indirgeme gücü Cardenas ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (41). Ekstraktlar ve standartların 50-250 µg/mL konsantrasyonları kullanıldı.

Metotta öncelikle her bir deney tüpüne 1 mL 10 mM $CuCl_2$, 1 mL 7.5 mM neokuproin, NH_4Ac tamponu (1 M, pH=7.0) çözeltisi eklenir. Daha sonra her tüpe farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlardan 0,5 mL eklenip, toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde saf su ilave edildi. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika beklendi. Aynı işlemler aynı konsantrasyonlarda hazırlanan askorbik asit çözeltileri içinde yapıldı. Bu süre sonunda absorbansları 450 nm'de okundu. Testin sonuçları EC_{50} değerleri kullanılarak da değerlendirildi.

Linoleik Asit Sisteminde Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Metodu ile Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Bu metotta *in vitro* koşullarda linoleik asit oksidasyonu oluşturulur ve yöntem oksidasyon sonucu oluşan peroksitleri ölçme esasına dayanır. Belirli aralıklarla inkübasyondaki karışımdan örnek alınarak spektrofotometrik ölçüm ile peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder. Analiz Pan ark. (2007), Mitsuda ark. (1966)'nin uyguladığı yöntemler temel alınarak uygulanmıştır (42).

Yaprak ekstraktları ve standart çözeltilerin 1 mL'sine 1,5 mL fosfat tamponu (0,04 mM, pH=7.4) ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu eklendi. Çözeltiler karıştırıldıktan sonra 37 °C'de karanlıkta inkübe edildi. 12 saatte bir çözeltilerden 0.1 mL alınıp üzerine 3.7 mL %75'lik etil alkol ve 0.1 mL %30'luk NH_4SCN eklendi. 3 dk sonra reaksiyon karışımlarına 0.1 mL $FeCl_2$ (20 mM) çözeltisi eklendi. 5 dk sonra oluşan rengin absorbansı 500 nm'de okundu. Oluşan peroksitler Fe^{2+} iyonlarını Fe^{3+}'e yükseltger. Oluşan Fe^{3+}, tiyosiyanat ile reaksiyona girerek 500 nm'de maksimum renge sahip bir kompleks oluşturur. Kontrol olarak antioksidan madde içermeyen 2.5 mL fosfat tamponu (0.04 M, pH=7) ve 2.5 mL linoleik asit emülsiyonu kullanılır. Yaprak ekstraktları ve standartlar 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Standart olarak askorbik asit, BHA, BHT ve α-tokoferol kullanıldı.

Lipid peroksidasyonu inhibisyonu (%) = $[1- (A_{örnek} / A_{kontrol})] \times 100$

Burada $A_{kontrol}$, kontrolün maksimuma ulaştığı inkübasyon anındaki verdiği absorbans değeri, $A_{örnek}$ ise kontrol değerinin maksimuma ulaştığı inkübasyon anındaki ekstrakt ya da standartların verdiği absorbans değerini ifade eder.

Klorofil Tayini

Labada yaprağının klorofil içeriği Arnon tarafından modifiye edilen metoda göre belirlendi (15).

100 mg yaprak materyali, eser miktardaki $CaCO_3$ ve 6 mL soğuk asetonla (%80'lik) homojenize edildi. Yaprak homojenatları 20 dk boyunca 15 °C'de 3500 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatantların yaklaşık olarak 4,8-5,8 mL'si alındı. Toplam klorofil içeriği, süpernatantların 645 ve 663 nm'de absorbanslarının ölçümü ile belirlendi.

Yaprakların klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içerikleri aşağıdaki formüllere göre mg/kg cinsinden hesaplandı.

Klorofil a miktarı (mg/kg) = $12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$

Klorofil b miktarı (mg/kg) = $22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$

Toplam klorofil miktarı (mg/kg) = $20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$

Karotenoid Tayini

Labada yapraklarının karotenoid içeriğinin tayini Alasalvar ve arkadaşlarının belirledikleri yönteme göre yapıldı (40).

300-500 mg kuru yaprak aseton-su (9:1 v/v) karışımının 5 ml'si ile ekstrakte edildi. 4 ^{o}C'de 10 dk 3000 rpm'de santrifüjlendi. Açık renkli süpernatant alındı ve ekstraksiyon 3 ml aseton-su karışımı ile 5-6 kez renksiz oluncaya kadar tekrarlandı.

Ekstraktlar birleştirildi ve şahit olarak asetona karşı 471 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Aşağıdaki denkleme göre toplam karotenoid madde miktarının % değeri hesaplandı.

Toplam Karotenoid İçeriği (%): Amax x 25ml aseton x 100 /yaprak ağırlığı (mg)

LC-MS/MS Yöntemi ile Fenolik Madde Analizi

Çalışmada LC-MS/MS (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/ Sıralı Kütle Spektrofotometresi) olarak Agilent Technologies 6460 Triple Quad kullanılmıştır.

LC-MS/MS; kromatografi ve spektrometri sistemlerinin bir araya getirilmesi ile oluşturulmuş bir sistemdir. Fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan örnek moleküler kütle dedektörü ile analiz edilmektedir.

Bitkilerde fenolik bileşik, dokular ile plazmada hormon ve metabolit, gıdalarda pestisit, sularda kalıntı ve kirlilik tayini LC-MS/MS ile yapılabilir.

Bir LC-MS/MS sistemi, bir elektrosprey iyonlaştırıcı kaynak ile donatılmış bir kütle spektrometresi ile birleştirilen ikili pompa ve otomatik örnekleyiciden oluşmaktadır. Reverse faz LC ayrımı Agilent Zorbax SB-C8 kolonu kullanılarak gerçekleştirildi ve koruma kartuşu kullanılarak koruma sağlandı (43).

Kütle spektrometresi aşağıdaki parametrelerle negatif iyon modunda çalıştırıldı; kapiler voltaj 3.0 kilovolt, koni voltajı 20 volt, ekstraktör 2 volt. Kaynak sıcaklığı 100 ^{o}C, desolvasyon sıcaklığı 350 ^{o}C, koni gaz akış hızı 30l / sa ve desolvasyon gaz akış hızı 350l / sa. Mobil faz bileşenleri; %0.1'lik formik asit ve asetonitrildir. Enjeksiyon hacmi 10 mL ve kolonun sıcaklığı 25 ^{o}C'dir. Mobil fazın akış hızı 0.300 mL/dakikadır.

Çalışmada 2,5-dihidroksibenzoik asit, 2-hidroksitrans sinnamik asit, absisik asit, kafeik asit, kateşin, klorojenik asit, ellagik asit, epikateşin, etilgallat, gallik asit, gibberallik

asit, indol-3-asetik asit, izo-hamnetin, kamferol, jasmonik asit, kumarin, lutolein, mirisetin, naringin, *p*-kumarik asit, piropil gallat, protokatekuik asit, quersetin, resveratrol, rutin, salisilik asit, sinapik asit, siringik asit, trans ferulik, GSH, GSSG kullanılan standart maddelerdir.

Yöntem kullanılan standart fenolik bileşikler yardımıyla analizi yapılan labada yapraklarının hangi fenolik bileşikleri içerdiğini ve bunların miktarlarını tayin etmeyi amaçlar.

İstatistik Analizler

Tüm deneylerde üç paralel ölçüm alındı ve standart sapmalar hesaplandı. Grafikler Windows 10 Excell programında çizildi.

BULGULAR

Labada yapraklarının taze ve kuru örneklerin su ve metanol ekstraktlarının antioksidan özellikleri çeşitli metotlar kullanılarak incelendi.

Labada yapraklarının su ve metanol ekstraktlarında bileşiklerin verimleri taze ekstrakt cinsinden sırasıyla 48.04 mg/g ve 58.38 mg/g olarak hesaplandı (Tablo 2).

Tablo 2. Taze labada yapraklarının ekstrakt verimleri

TAZE LABADA		
Ekstrakt	**Su**	**Metanol**
Hammadde (g)	25	25
Ekstraksiyon verimi (mg/g)	48.04	58.38
Ekstraksiyon verimi (%)	4.804	5.838

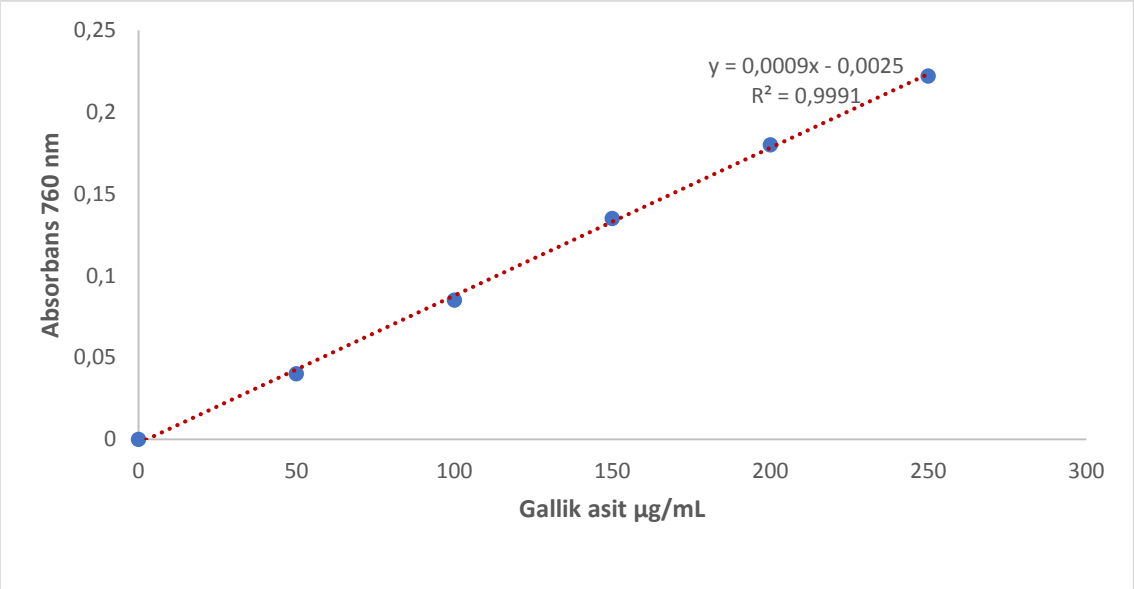
Labada yapraklarının su ve metanol ekstraklarında bileşiklerin verimleri kuru ekstrakt cinsinden sırasıyla 52.80 mg/g ve 150.26 mg/g olarak hesaplandı. Tablo 3'te görüldüğü üzere en yüksek verimin metanol ekstraktında olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 3. Kuru labada yapraklarının ekstrakt verimleri

KURU LABADA		
Ekstrakt	**Su**	**Metanol**
Hammadde (g)	25	25
Ekstraksiyon verimi (mg/g)	52.80	150.26
Ekstraksiyon verimi (%)	5.280	15.026

TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK (TPC) TAYİNİ

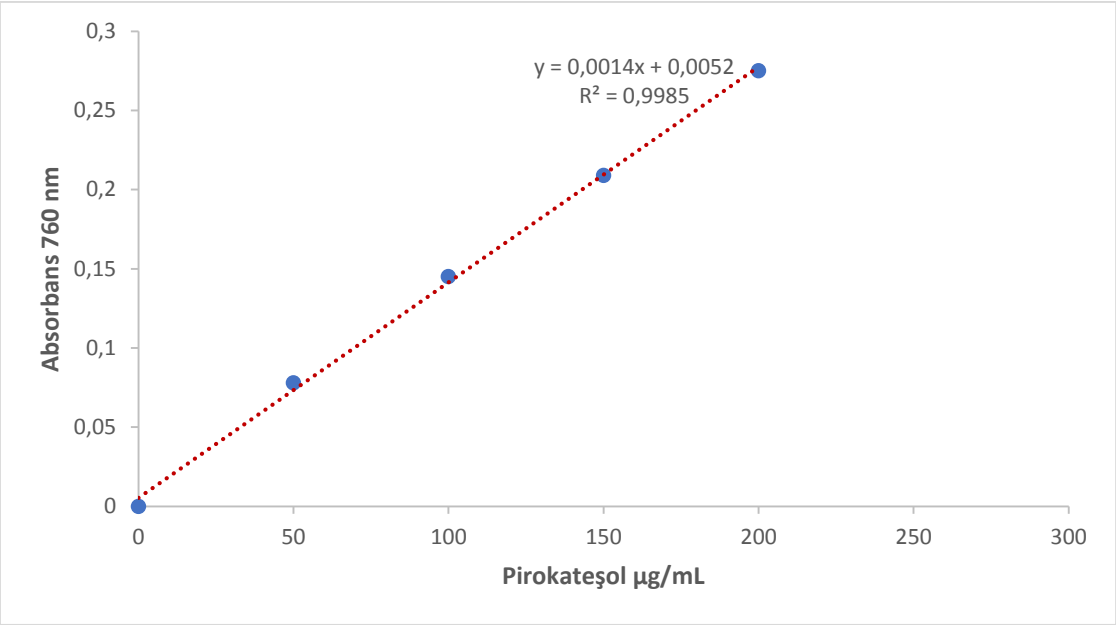
Labada yapraklarının taze ve kuru örneklerinin su ve metanol ekstraklarında bulunan toplam fenolik bileşikleri tayin etmek amacıyla Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanıldı. Standart grafikleri elde etmek için gallik asit ve pirokateşol kullanıldı (Şekil 14 ve Şekil 15). Ekstraktların içerdiği toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) ve pirokateşol eşdeğeri (PKE) olarak belirlendi.



Şekil 14. Gallik asit standart grafiği

Gallik asit standart grafiği denklemi y=0,0009x-0,0025 bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

Absorbans $_{(760nm)}$ = 0.0009[Gallik Asit]-0.0025



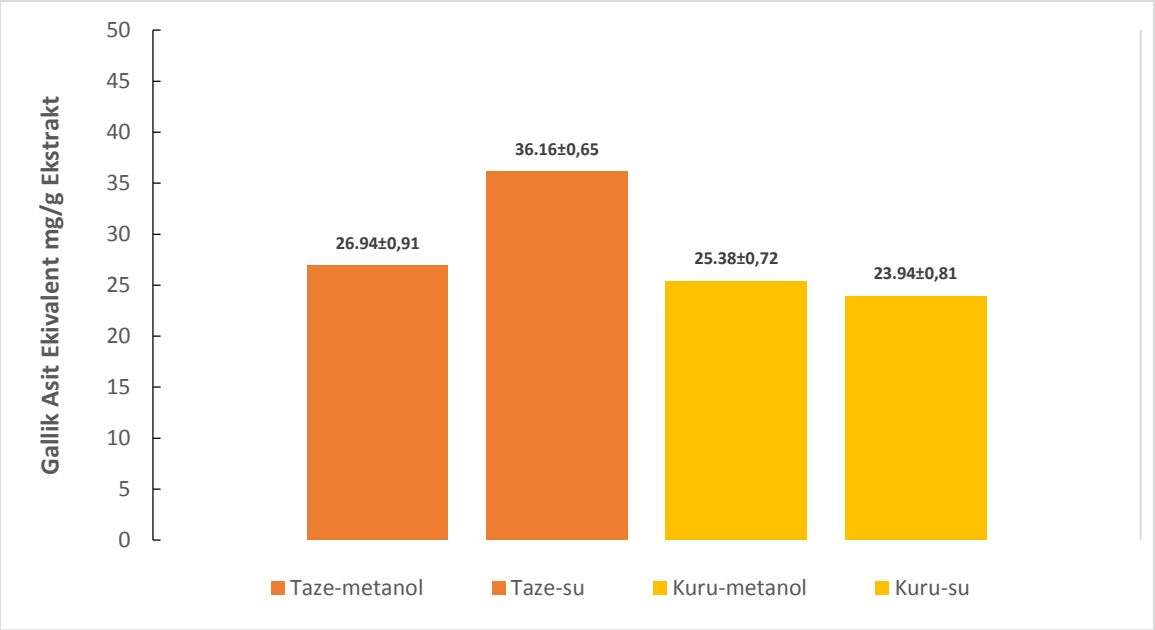
Şekil 15. Pirokateşol standart grafiği

Pirokateşol standart grafiği denklemi y=0,0014x+0,0052 bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

Absorbans$_{(760nm)}$ = 0.0014 [Pirokateşol] + 0.0052

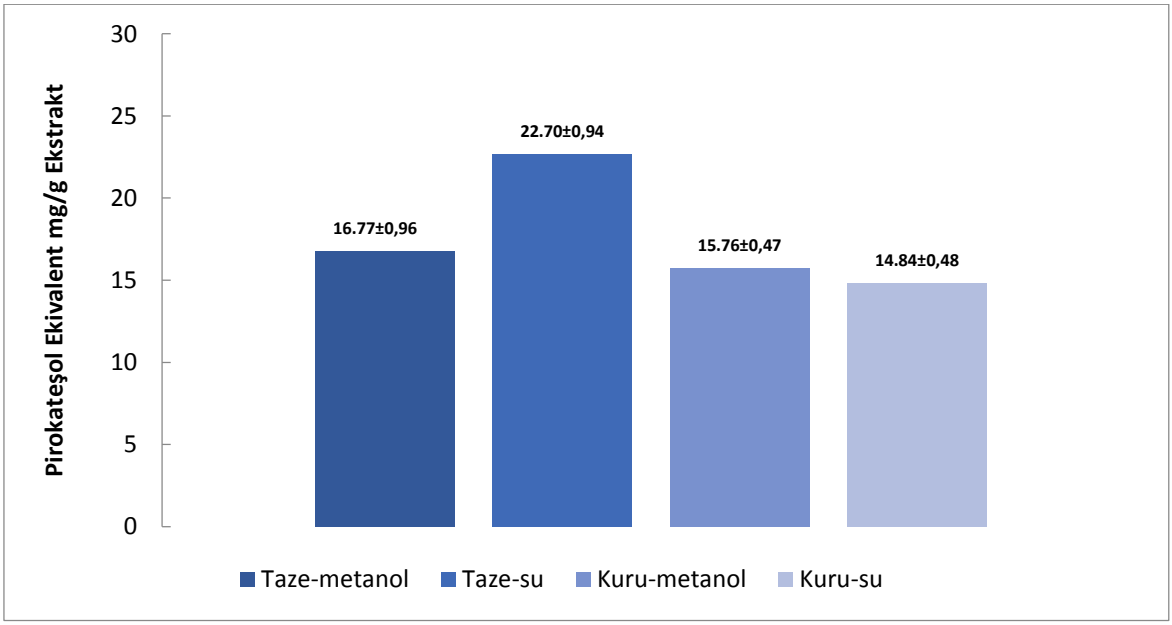
Labada yapraklarının taze ve kuru örneklerinin su ve metanol ekstraktlarından elde edilen fenolik bileşik içerikleri gallik asit ve pirokateşol eşdeğer miktarı olarak hesaplanmıştır (Şekil 16 ve Şekil 17).

Taze labada yapraklarının metanol ekstraktının 26.94±0,91 mg/g, su ekstraktının 36.16±0,65 mg/g, kuru labada yapraklarının ise metanol ekstraktının 25.38±0,72 mg/g, su ekstraktının 23.94±0,81 mg/g gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik maddeye sahip olduğu belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Labada ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik madde içerikleri

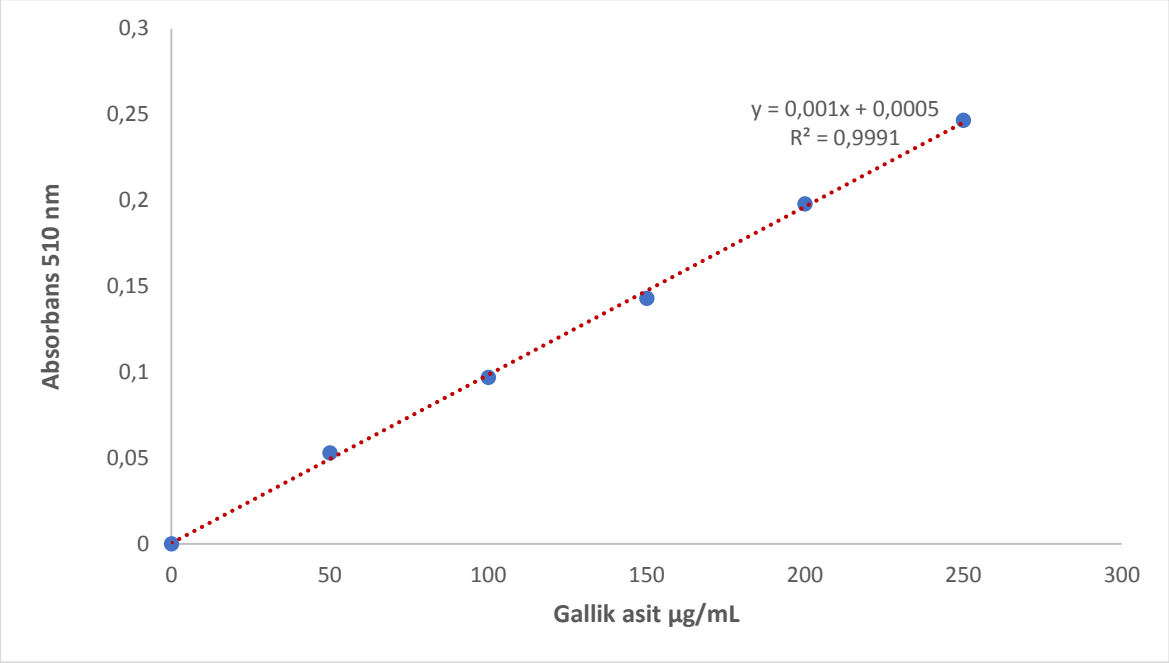
Taze labada yapraklarının metanol ekstraktının 16.77±0,96 mg/g, su ekstraktının 22.70±0,94 mg/g, kuru labada yapraklarının ise metanol ekstraktının 15.76±0,47 mg/g, su ekstraktının 14.84±0,48 mg/g pirokateşol eşdeğeri cinsinden fenolik maddeye sahip olduğu belirlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Labada ekstraktlarının pirokateşol eşdeğeri cinsinden fenolik madde içerikleri

TOPLAM FLAVONOİD İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

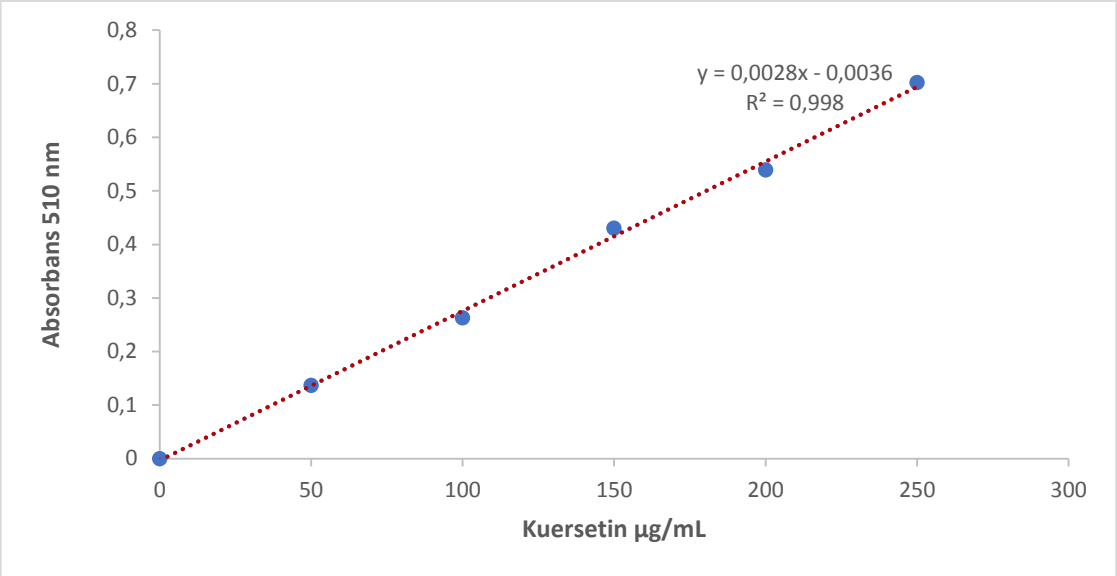
Labada yapraklarının taze ve kuru örneklerinin su ve metanol ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid içeriğini tayin etmek amacıyla gallik asit ve kuersetin standart grafikleri oluşturuldu (Şekil 18 ve Şekil 19). Ekstraktların içerdiği toplam flavonoid miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) ve kuersetin eşdeğeri (QUE) olarak saptandı.



Şekil 18. Gallik asit standart grafiği

Gallik asit standart grafiği denklemi y=0,001x+0,0005 bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$Absorbans_{(510\ nm)}$ = 0.001 [Gallik asit] + 0.0005

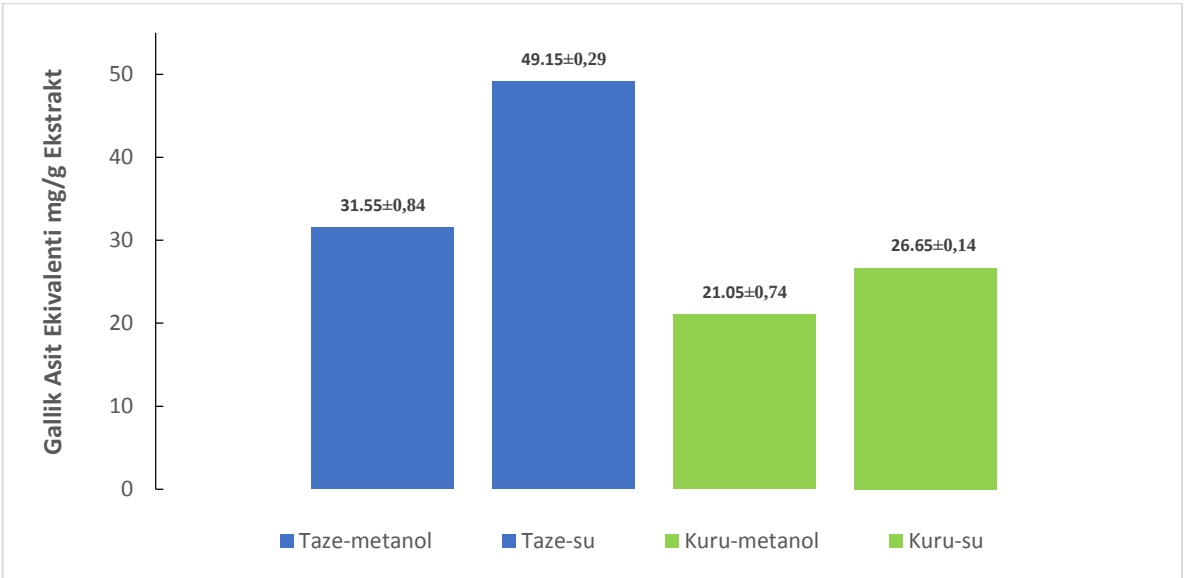


Şekil 19. Kuersetin standart grafiği

Kuersetin standart grafiği denklemi y=0,0028x-0,0036 bulundu ve hesaplama aşağıdaki formüle göre yapıldı.

Absorbans$_{(510\ nm)}$ = 0.0028 [Kuersetin] + 0.0036

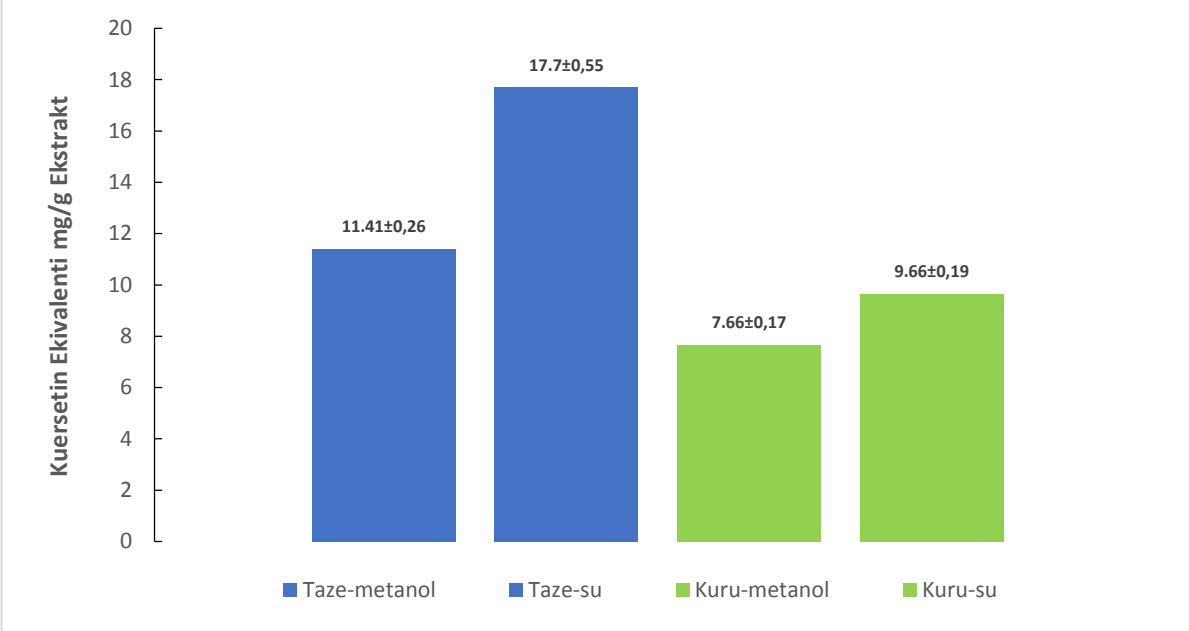
Labada yapraklarının taze ve kuru örneklerinin su ve metanol ekstraktlarından elde edilen gallik asit ve kuersetin eşdeğeri olan flavonoid bileşiklerine ait değerler hesaplanmıştır (Şekil 20 ve Şekil 21).



Şekil 20. Labada ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri

Taze labada yapraklarının metanol ekstraktının 31.55±0,84 mg/g, su ekstraktının 49.15±0,29 mg/g, kuru labada yapraklarının ise metanol ekstraktının 21.05±0,74, su ekstraktının 26.65±0,14 mg/g gallik asit eşdeğeri cinsinden flavonoid madde içerdikleri belirlenmiştir (Şekil 20).

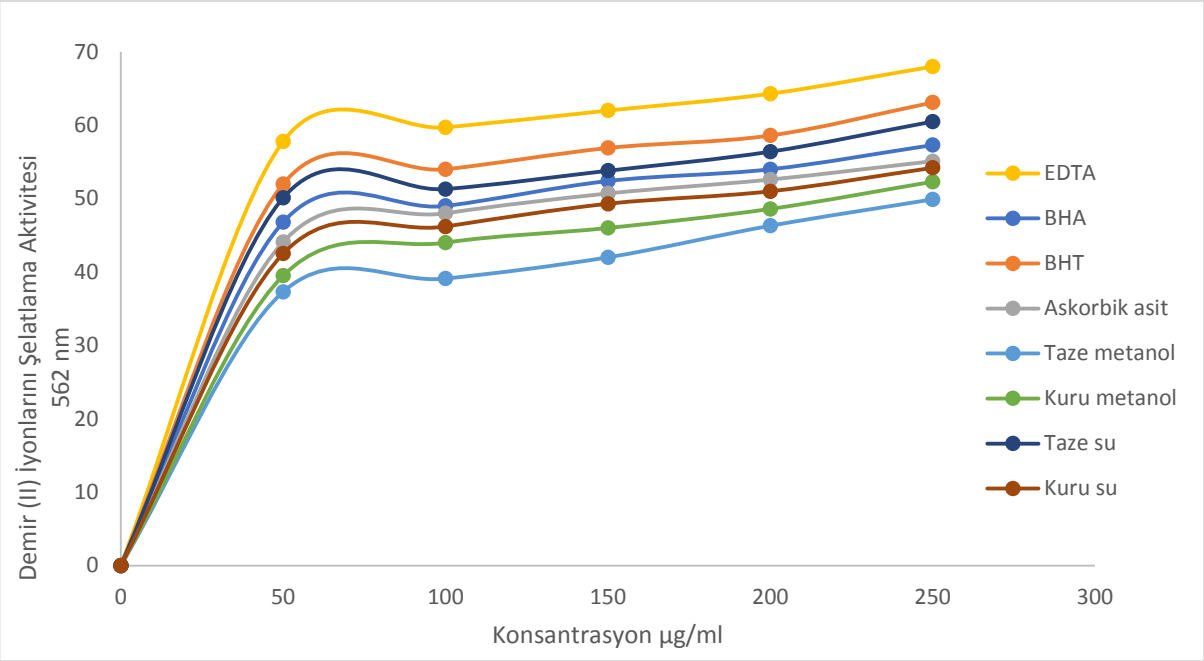
Taze labada yapraklarının metanol ekstraktının 11.41±0,26 mg/g, su ekstraktının 17.70±0,55 mg/g, kuru labada yapraklarının ise metanol ekstraktının 7.66±0,17 mg/g, su ekstraktının 9.66±0,19 mg/g kuersetin eşdeğeri cinsinden flavonoid madde içerdikleri belirlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Labada ekstraklarının kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri

DEMİR (II) İYONLARINI ŞELATLAMA AKTİVİTESİ

Labada yapraklarının taze ve kuru ekstraktlarının Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesini tayin etmek amacıyla standart olarak EDTA, BHT, BHA ve askorbik asit kullanıldı (Şekil 22).



Şekil 22. Labada ekstraktlarının metal iyonlarını şelatlama aktiviteleri

Grafikte de görüldüğü üzere, ekstraktlar konsantrasyon artışı ile artan şelatlama kapasitesi gösterdi. Taze labada yapraklarının su ekstraktının BHA ve askorbik asit ekstraktlarından daha yüksek aktivite gösterdiği saptandı (Tablo 4).

Tablo 4. Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin metal şelatlama kapasiteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
EDTA	57.80±0,57	59.70±0,49	62.00±0,64	64.30±0,21	68.00±0,67
Askorbik Asit	44.10±0,45	48.00±0,07	50.70±0,21	52.60±0,11	55.10±0,44
BHA	46.80±0,13	49.00±0,14	52.40±0,14	54.00±0,15	57.3±0,16
BHT	52.00±0,31	54.00±0,32	56.90±0,32	58.60±0,33	63.10±0,34

Taze labada yapraklarının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla 37.30±0,538, 39.10±0,77, 42.00±0,88, 46.30±0,59, 49.90±0,19 olarak belirlenmiştir.

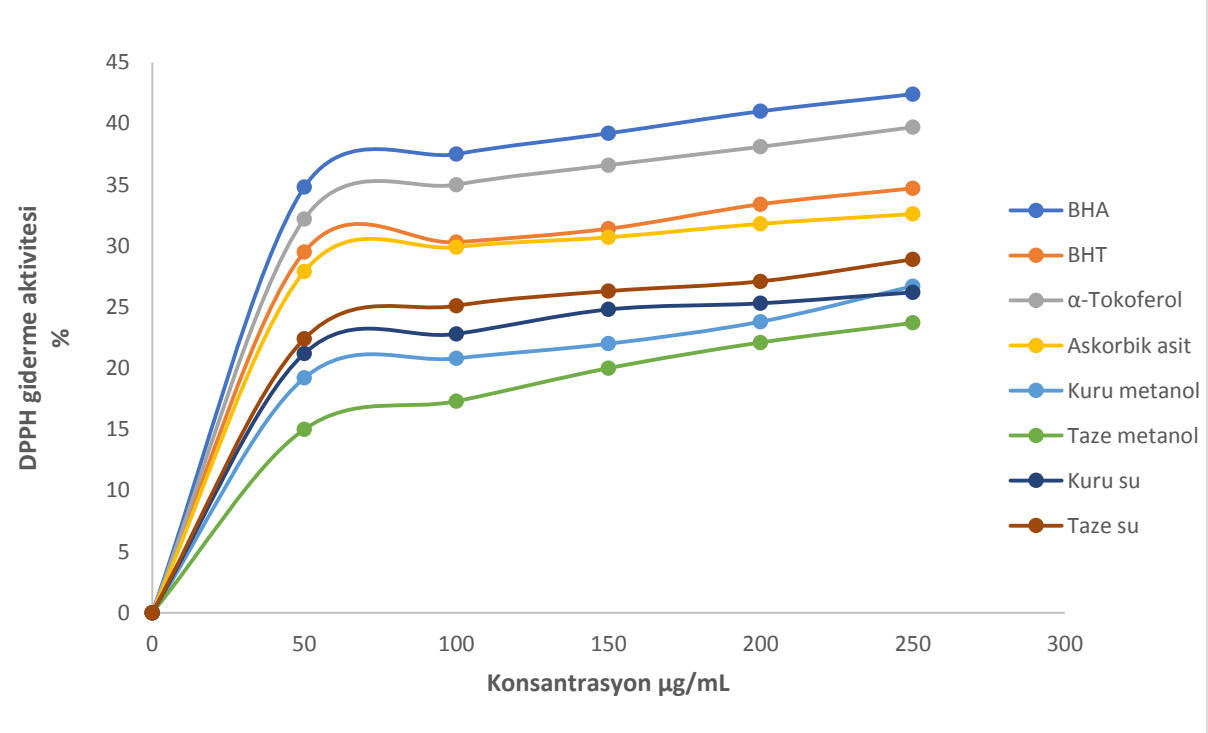
Taze labada yapraklarının su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla 50.11±0,35, 51.30±0,17, 53.80±0,44, 56.40±0,01, 60.50±0,11 olarak belirlenmiştir.

Kuru labada yapraklarının metanol ekstraktının 50-250 µg/ml konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla 39.50±0,25, 44.00±0,37, 46.00±0,38, 48.60±0,329, 52.30±0,07 olarak bulundu.

Kuru labada yapraklarının su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla 42.50±0,36, 46.20±0,01, 49.30±0,10, 51.00±0,28, 54.20±0,02 olarak bulundu.

DPPH• RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Metod 517 nm'de absorbans vermeyen DPPH•H oluşumunun ölçülmesine dayanmaktadır. Standart olarak askorbik asit, BHA, α-tokoferol ve BHT kullanılarak labada ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri belirlendi (Şekil 23).



Şekil 23. Labada ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri

Grafikte görüldüğü üzere, ekstraktların konsantrasyon artışı ile artan radikal giderme aktivitesi gösterdiği saptandı. Tablo 5'te standartların aktiviteleri verilmiştir.

Tablo 5. DPPH• radikali giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin radikal giderme aktiviteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
α-tokoferol	32.30±0,10	35.00±0,33	36.60±0,37	38.10±0,26	39.70±0,45
Askorbik Asit	27.90±0,21	29.90±0,20	30.70±0,34	31.80±0,13	32.60±0,27
BHA	34.80±0,37	37.50±0,18	39.20±0,27	41.00±0,45	42.40±0,05
BHT	29.50±0,02	30.30±0,28	31.40±0,21	33.40±0,18	34.70±0,27

Taze labada yapraklarının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla 15.00±0,27, 17.30±0,15, 20.00±0,33, 22.10±0,26, 23.70±0,42 olarak bulundu.

Taze labada yapraklarının su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla 22.40±0,04, 25.10±0,35, 26.30±0,06, 27.10±0,28, 28.90±0,67 olarak tespit edildi.

Kuru labada yapraklarının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla 19.20±0.72, 20.80±0,48, 22.00±0,35, 23.80±0,77, 26.70±0,12 olarak bulundu.

Kuru labada yapraklarının su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla 21.20±0,56, 22.80±0,83, 24.80±0,64, 25.10±0,62, 26.20±0,93 olarak belirlenip, EC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 6 ve Tablo 7).

Tablo 6. DPPH• radikali verilerinden ekstraktların hesaplanan EC_{50} değerleri

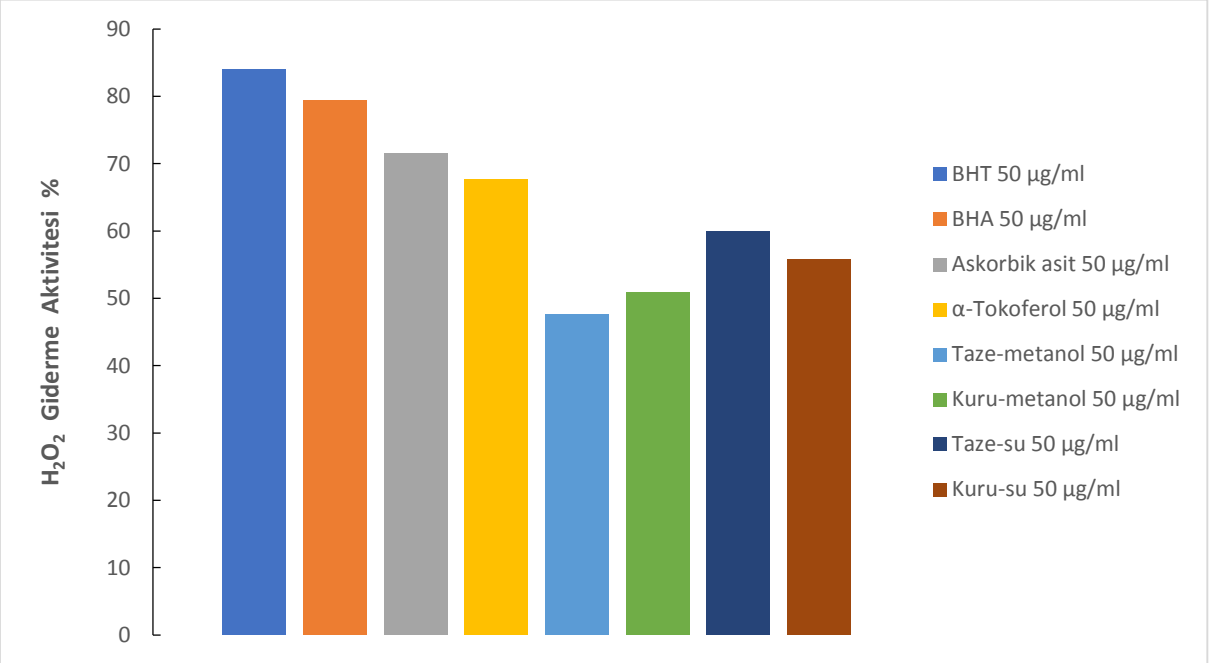
Ekstraktlar	Taze labada su	Taze labada metanol	Kuru labada su	Kuru labada metanol
EC_{50}(µg/mL)	8.46±0,75	9.73±0,25	9.28±0,59	10.62±0,33

Tablo 7. DPPH• radikali verilerinden standartların hesaplanan EC_{50} değerleri

Ekstraktlar	α-tokoferol	BHA	BHT	Askorbik asit
EC_{50}(µg/mL)	18.26±0,33	17.34±0,43	16.81±0,44	15.79±0,52

H_2O_2 GİDERME AKTİVİTESİ

Ekstraktlar arasında en yüksek H_2O_2 giderme aktivitesine taze labada yaprağının su ekstraktı sahiptir. Çalışmada kullanılan diğer ekstraktlar ise standartlardan daha az H_2O_2 giderme aktivitesi göstermiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Labada ekstraktları ve standartların H_20_2 giderme aktiviteleri

Grafikte görüldüğü üzere en yüksek H_2O_2 giderme aktivitesine 50 µg/mL konsantrasyondaki BHT standartı sahiptir.

Taze labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının H_2O_2 giderme aktiviteleri sırasıyla 47.60±0,84, 45.50±0,89, 31.30±0,77, 30.86±0,72, 29.82±0,74 olarak tespit edildi.

Taze labada yaprağının su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının H_2O_2 giderme aktiviteleri sırasıyla 60.00±0,43, 58.62±0,22, 57.00±0,51, 47.60±0,19, 44.82±0,47 olarak belirlendi.

Kuru labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının H_2O_2 giderme aktiviteleri sırasıyla 50.80±0,91, 49.31±0,54, 46.70±0,16, 45.60±0,15, 42.00±0,38 olarak bulundu.

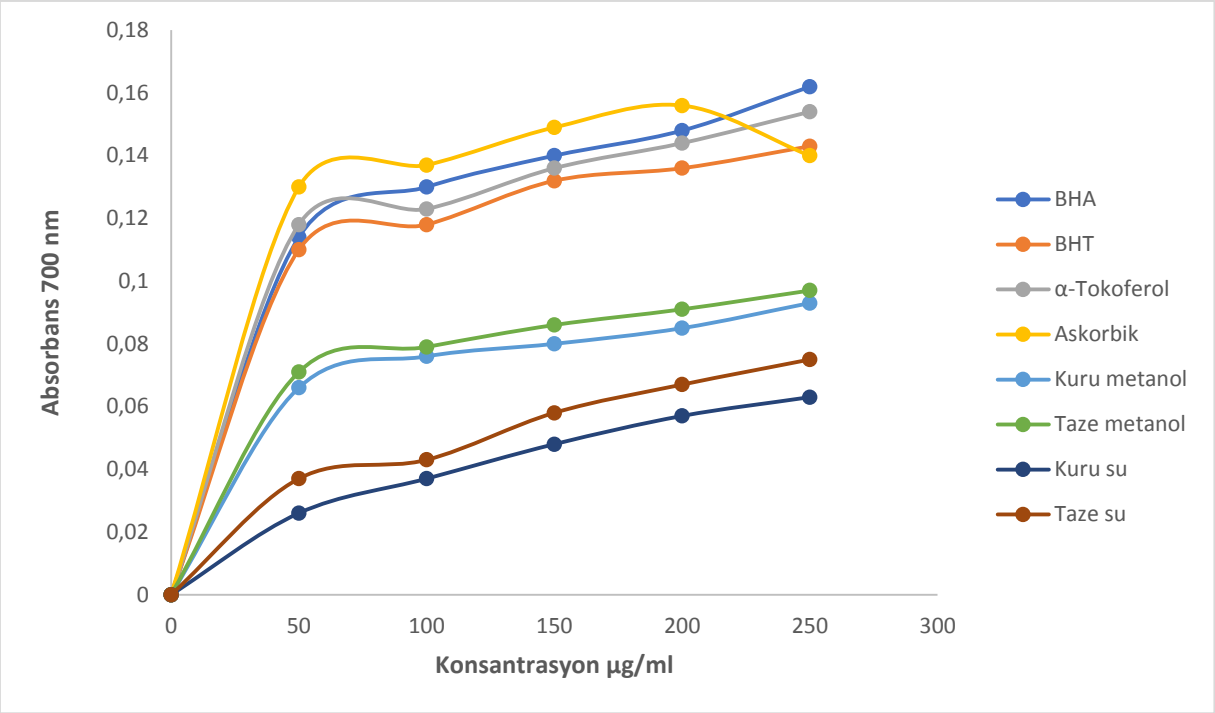
Kuru labada yaprağının su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının H_2O_2 giderme aktiviteleri sırasıyla 55.80±0,04, 52.00±0,03, 48.20±0,41, 43.96±0,61, 40.20±0,21 olarak tespit edildi. Tablo 8'de standartların aktiviteleri gösterilmiştir.

Tablo 8. H_2O_2 giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin radikal giderme aktiviteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
α-tokoferol	67.70±0,56	66.20±0,02	65.00±0,21	64.10±0,17	63.00±0,26
Askorbik Asit	71.55±0,01	70.00±0,57	66.00±0,54	65.00±0,49	63.00±0,48
BHA	79.11±0,17	78.40±0,23	75.50±0,43	73.10±0,33	70.20±0,17
BHT	83.96±0,03	82.70±0,26	76.20±0,42	74.10±0,58	70.80±0,26

TOPLAM FERRİK İYONLARINI (Fe^{3+}) İNDİRGEME KAPASİTESİNİN TAYİNİ

Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasitesini tayin etmek için ekstraktların ve standartların 50-250 µg/mL aralığındaki konsantrasyonları kullanıldı. Absorbans 700 nm'de okundu. Labada yaprağı ekstraktları, askorbik asit, BHA, BHT ve α-tokoferol standartlarıyla karşılaştırılarak konsantrasyon-absorbans grafiği oluşturuldu (Şekil 25).



Şekil 25. Labada yaprağı ekstraktları ve standartların Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme kapasiteleri

Şekilde taze labada yaprağının metanol ekstraktı diğer ekstraktlardan daha yüksek indirgeme kapasitesi göstermiştir. Tablo 9'da standartların indirgeme kapasiteleri verilmiştir.

Tablo 9. Standart çözeltilerin Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
α-tokoferol	0.118±0,023	0.123±0,015	0.136±0,001	0.144±0,007	0.154±0,028
Askorbik Asit	0.130±0,030	0.137±0,021	0.149±0,004	0.156±0,010	0.160±0,014
BHA	0.114±0,024	0.130±0,018	0.140±0,012	0.148±0,010	0.162±0,033
BHT	0.110±0,017	0.118±0,011	0.132±0,005	0.136±0,010	0.143±0,019

Taze labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.071±0,018, 0.079±0,007, 0.086±0,003, 0.091±0,009, 0.097±0,014 olarak bulundu.

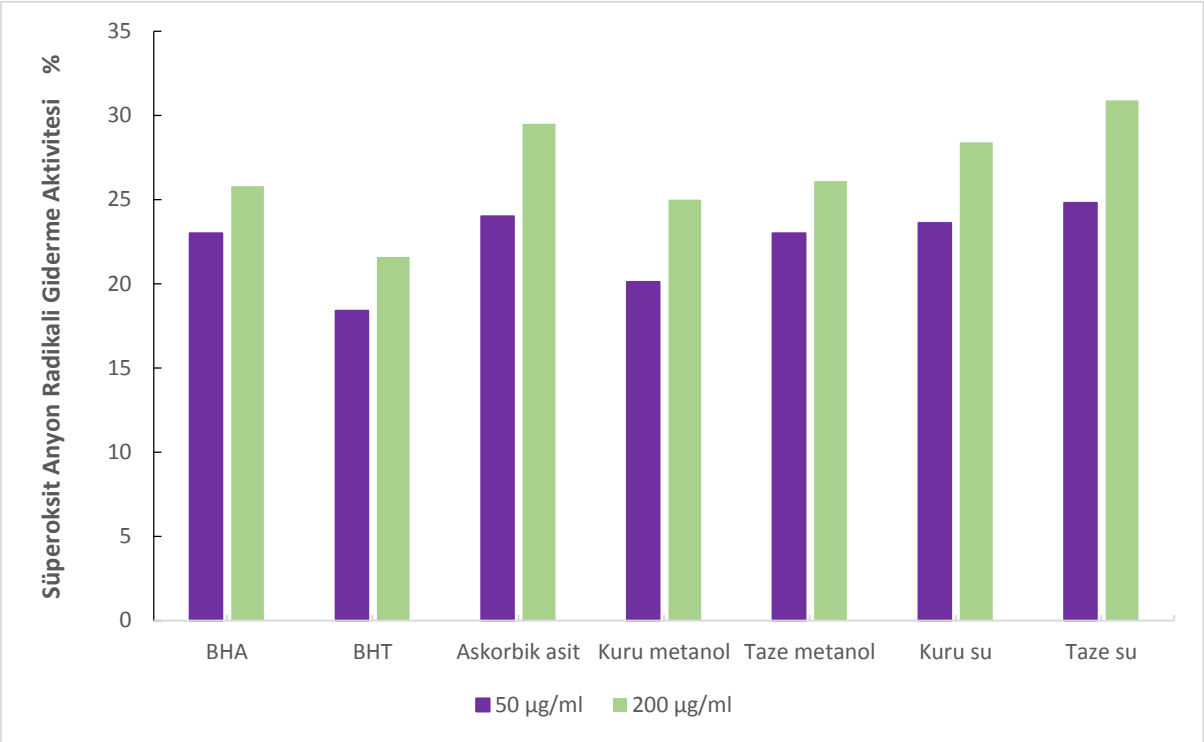
Taze labada yaprağının su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.037±0,021, 0.043±0,015, 0.058±0,001, 0.067±0,010, 0.075±0,024 olarak tespit edildi.

Kuru labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.066±0,016, 0.076±0,007, 0.080±0,002, 0.090±0,008, 0.093±0,012 olarak belirlendi.

Kuru labada yaprağının su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.026±0,020, 0.037±0,008, 0.048±0,003, 0.057±0,011, 0.063±0,017 olarak tespit edildi.

SÜPEROKSİT ANYON RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİ

Süperoksit radikali PMS/NADH/O_2 sistemi kullanılarak oluşturuldu. BHT, BHA ve askorbik asit standartları kullanılarak % radikal giderme aktivitesi grafiği çizildi (Şekil 26).



Şekil 26. Labada yaprağı ekstraktları ve standartların süperoksit anyon radikali giderme aktiviteleri

Grafikte görüldüğü üzere konsantrasyon artışı ile radikal giderme aktivitesi de artmıştır. Tablo 10'da standartların radikal giderme aktiviteleri verilmiştir.

Tablo 10. Standart çözeltilerinin süperoksit anyon radikali giderme aktiviteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
BHA	23.00±0,23	24.10±0,14	25.10±0,14	25.80±0,66	26.20±0,04
BHT	18.40±0,12	19.70±0,28	20.80±0,33	21.60±0,08	22.10±0,04
Askorbik Asit	24.00±0,34	26.00±0,37	28.60±0,30	29.50±0,21	33.60±0,22

Taze labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 23.00±0,32, 24.00±0,37, 24.90±0,68, 26.10±0,29, 28.60±0,33 olarak bulundu.

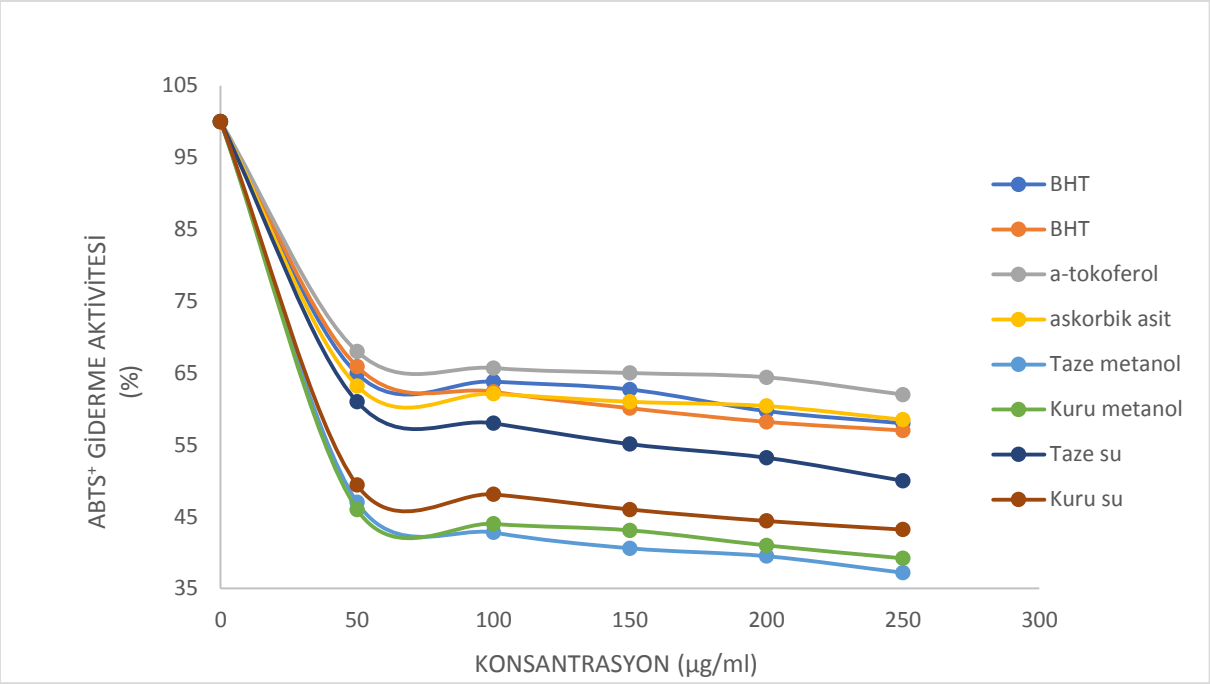
Taze labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 24.60±0,38, 25.90±0,69, 28.00±0,31, 30.00±0,35, 32.00±0,34 olarak tespit edildi.

Kuru labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 20.10±0,047, 21.00±0,17 22.60±0,57, 25.00±0,18, 27.00±0,20 olarak belirlendi.

Kuru labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 23.60±0,22, 25.70±0,31, 27.20±0,29, 28.40±0,01, 29.20±0,28 olarak bulundu.

ABTS•$^{+}$ RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Labada ekstraktları ve standartların 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında çalışıldı ve konsantrasyona karşı % giderme aktivitesi grafiği çizildi (Şekil 27).



Şekil 27. Labada ekstraktları ve standartların ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri

Grafikten de anlaşılacağı gibi ABTS•⁺ radikali giderme aktivitesi konsantrasyona bağımlıdır. Tablo 11'de standart çözeltilerin radikal giderme aktiviteleri verilmiştir.

Tablo 11. Standart çözeltilerinin ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri

Standartlar	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
BHA	64.90±0,48	63.80±0,26	62.70±0,127	57.90±0.13	58.00±0,61
BHT	65.90±0,60	62.40±0,17	60.10±0,24	58.20±0,18	57.00±0,31
α-tokoferol	68.00±0,22	65.70±0,57	65.00±0,72	64.40±0,19	62.00±0,73
Askorbik asit	63.20±0,04	63.10±0,16	61.00±0,38	60.40±0,27	58.50±0,25

Taze labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında ABTS•⁺ radikali giderme aktiviteleri sırası ile 47.00±0,47, 42.80±0,439, 40.60±0,286, 39.50±0,144, 37.20±0,229 olarak bulundu.

Taze labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında ABTS•$^{+}$ radikali giderme aktiviteleri sırası ile 61.00±0,34, 58.00±0,03, 55.10±0,16, 50.20±0,44, 50.00±0,36 olarak tespit edildi.

Kuru labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında ABTS•$^{+}$ radikali giderme aktiviteleri sırası ile 46.00±0,23, 44.00±0,61, 43.10±0,018, 41.00±0,02, 39.20±0,88 olarak belirlendi.

Kuru labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında ABTS•$^{+}$ radikali giderme aktiviteleri sırası ile 63.20±0,16, 62.10±0,77, 61.00±0,03, 60.40±0,68, 58.50±0,71 olarak bulundu.

ABTS•$^{+}$ radikalinin %50'sini gidermek için ekstraktların gerekli konsantrasyonlarını ifade eden EC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 12).

Tablo 12. ABTS•$^{+}$ radikali verilerinden ekstraktların hesaplanan EC_{50} değerleri

Ekstraktlar	Taze labada yaprağı su	Taze labada yaprağı metanol	Kuru labada yaprağı su	Kuru labada yaprağı metanol
EC_{50}(µg/mL)	10.85±0,55	13.25±0,28	10.12±0,50	12.65±0,60

ABTS•$^{+}$ radikalinin %50'sini gidermek için standartların gerekli konsantrasyonlarını ifade eden EC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Tablo 13).

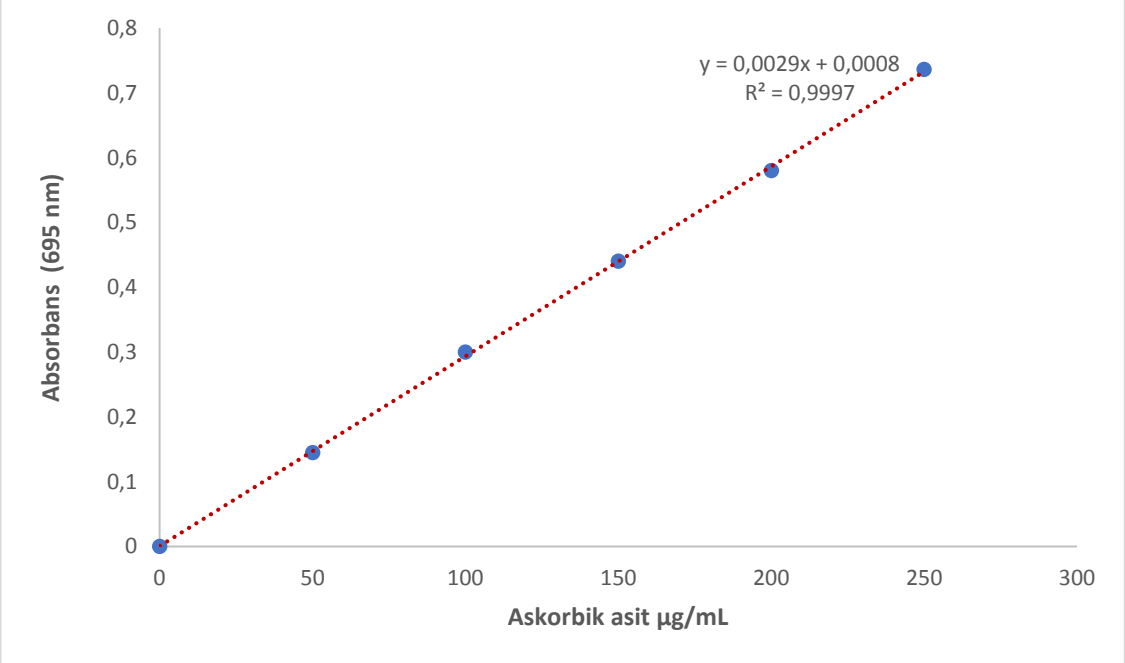
Tablo 13. ABTS•$^{+}$ radikali verilerinden standartların hesaplanan EC_{50} değerleri

Ekstraktlar	α-tokoferol	BHA	BHT	Askorbik asit
EC_{50}(µg/mL)	14.20±0,40	15.34±0,75	14.96±0,36	15.25±0,30

FOSFOMOLİBDEN METODU İLE TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde askorbik asit ve α-tokoferol standart olarak kullanıldı ve ekstraktların antioksidan aktivite göstergeleri mg askorbik asit ekivalenti (mg askorbik asit/g ekstrakt) ve mg α-tokoferol ekivalenti (mg α-tokoferol/g ekstrakt) cinsinden hesaplandı. Şekil 28'de askorbik asit standart grafiği gösterilmiştir.

Absorbans $_{(695\ nm)}$ = 0,0029[askorbik asit] + 0,0008



Şekil 28. Askorbik asit standart grafiği

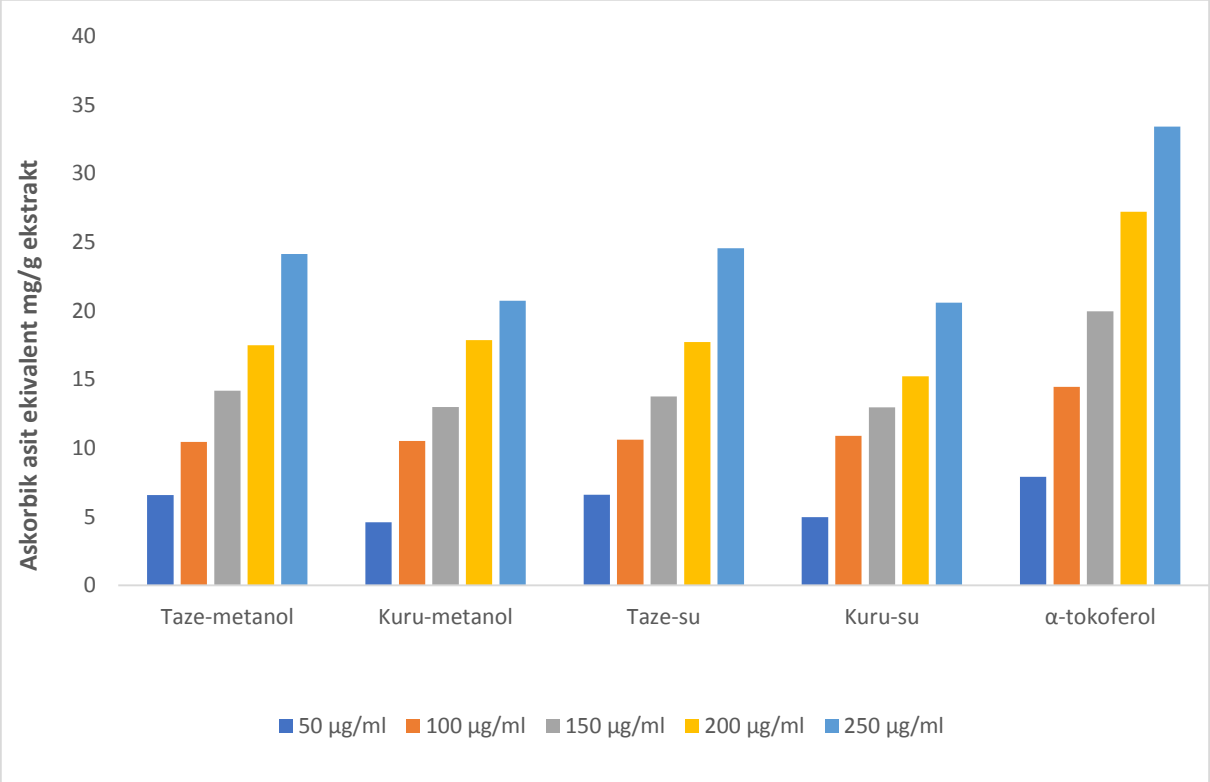
Toplam antioksidan aktivite tayini metodunda labada ekstraktlarının ve α-tokoferolün askorbik asitle karşılaştırılarak antioksidan aktiviteleri verilmiştir (Şekil 29).

Taze labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında antioksidan kapasiteleri askorbik asit eşdeğeri cinsinden sırası ile; 6.59 mg/g, 10.45 mg/g, 14.17 mg/g, 17.48 mg/g, 24.14 mg/g olduğu tespit edildi.

Taze labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında antioksidan kapasiteleri askorbik asit eşdeğeri cinsinden sırası ile; 6.60 mg/g, 10.62 mg/g, 13.76 mg/g, 17.73 mg/g, 24.55 mg/g olarak bulundu.

Kuru labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında antioksidan kapasiteleri askorbik asit eşdeğeri cinsinden sırası ile; 4.59 mg/g, 10.52 mg/g, 13.00 mg/g, 17.86 mg/g, 20.73 mg/g olarak belirlendi.

Kuru labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında antioksidan kapasiteleri askorbik asit eşdeğeri cinsinden sırası ile; 4.97 mg/g, 10.90 mg/g, 12.97 mg/g, 15.24 mg/g, 20.59 mg/g olarak bulundu.

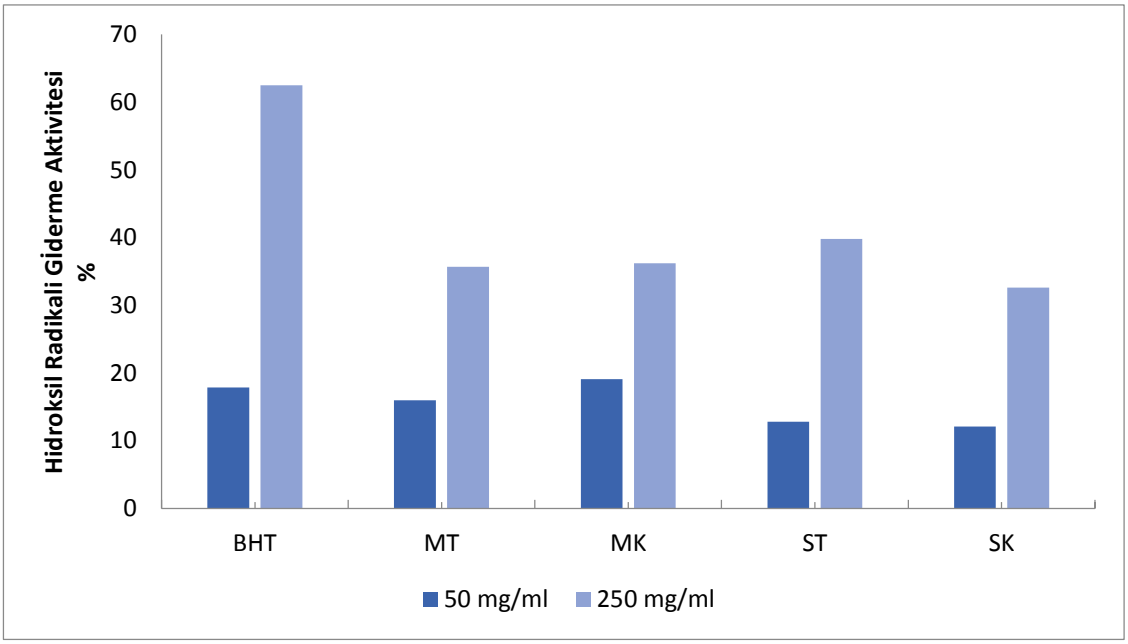


Şekil 29. Labada ekstraktları ve α-tokoferolün toplam antioksidan aktiviteleri

Konsantrasyon artışına bağlı olarak antioksidan kapasitesi de artış göstermiş olup, α-tokoferol standartının daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gözlendi.

HİDROKSİL RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİ

Labada ekstraktlarının hidroksil radikalini giderme aktivitesi hesaplandı (Şekil 30). Standart olarak BHT kullanılmıştır.



Şekil 30. Labada ekstraktları ve BHT standardının hidroksil radikali giderme aktiviteleri

Taze labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktiviteleri sırası ile; 16.00±0,19, 21.40±0,33, 26.20±0,15, 30.70±0,52, 35.70±0,93 olarak bulundu.

Taze labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktiviteleri sırası ile; 12.80±0,60, 21.40±0,27, 24.80±0,21, 28.70±0,13, 39.80±0,24 olarak belirlendi.

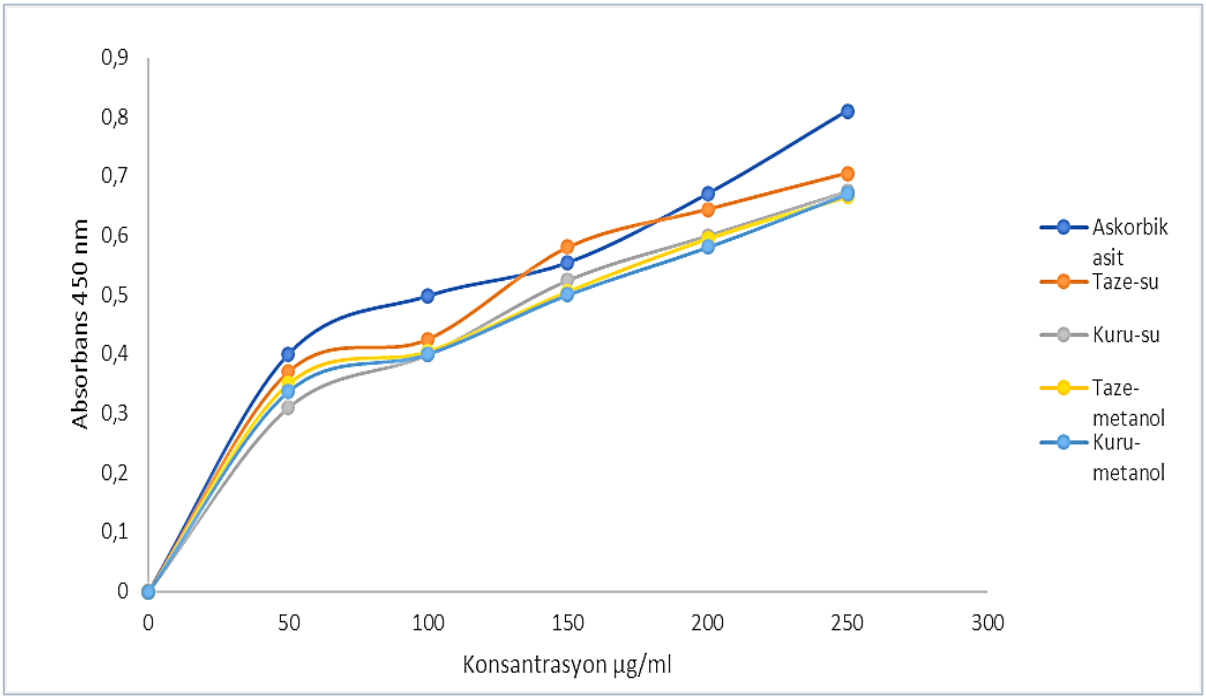
Kuru labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktiviteleri sırası ile; 19.10±0,23, 25.30±0,45, 30.00±0,98, 34.60±0,42, 36.20±0,34 olduğu tespit edildi.

Kuru labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktiviteleri sırası ile; 12.10±0,25, 20.00±0,56, 22.60±0,88, 28.20±0,58, 32.60±0,35 olarak bulundu.

BHT standartının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarındaki hidroksil radikali giderme aktivitesi değerleri sırası ile; 17.85±0,05, 33.39±0,04, 41.25±0,09, 52.67±0,08, 62.50±0,03 olarak belirlendi.

BAKIR İYONLARINI İNDİRGEME POTANSİYELİ (CUPRAC METODU)

Cu(II) iyonlarını indirgeme potansiyeline dayanarak toplam antioksidan kapasitesini ölçmek hedeflenmiştir. Şekil 31'de ekstraktların bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli verilmiştir.



Şekil 31. Askorbik asit ve ekstraktların bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli

Taze labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında bakır iyonlarını indirgeme gücü potansiyelleri sırası ile; 0.350±0,174, 0.405±0,108, 0.506±0,022, 0.595±0,091, 0.666±0,216 olarak tespit edildi.

Taze labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında bakır iyonlarını indirgeme gücü potansiyelleri sırası ile; 0.370±0,233, 0.425±0,168, 0.580±0,044, 0.644±0,183, 0.705±0,308 olarak belirlendi.

Kuru labada yaprağı metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında bakır iyonlarını indirgeme gücü potansiyelleri sırası ile; 0.337±0,269, 0.400±0,101, 0.500±0,038, 0.670±0,244 olarak bulundu.

Kuru labada yaprağı su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında bakır iyonlarını indirgeme gücü potansiyelleri sırası ile; 0.310±0,376, 0.400±0,202, 0.525±0,029, 0.600±0,118, 0.675±0,236 olduğu tespit edildi.

Askorbik asit standartının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında bakır iyonlarını indirgeme gücü potansiyeli sırası ile; 0.400±0,286, 0.498±0,098, 0.554±0.026, 0.670±0,188, 0.810±0,224 olarak bulundu. Bu verilerden EC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 14 ve Tablo 15).

Tablo 14. Ekstraktların bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli sonuçlarından hesaplanan EC_{50} değerleri

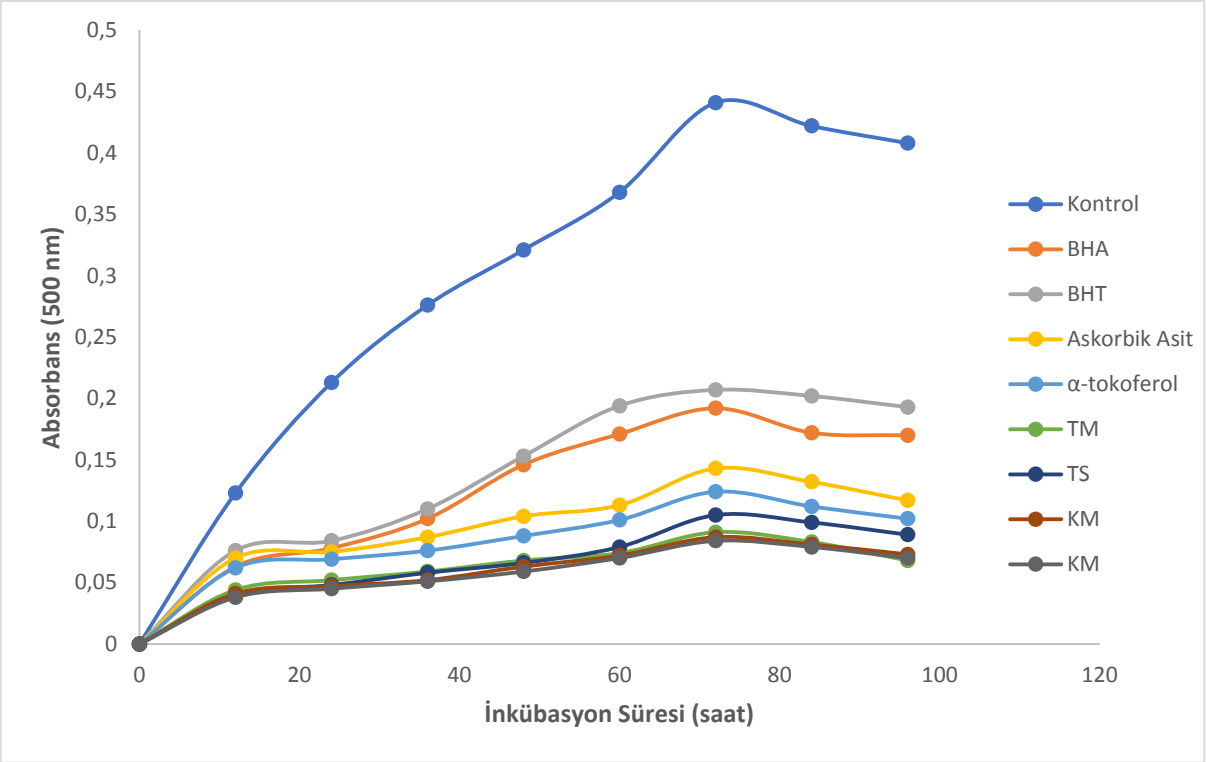
Ekstraktlar	Taze labada yaprağı su	Taze labada yaprağı metanol	Kuru labada yaprağı su	Kuru labada yaprağı metanol
EC_{50}(µg/mL)	0.145±0,055	0.196±0,075	0,172±0,050	0.188±0,025

Tablo 15. Askorbik asit standartının bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli sonuçlarından hesaplanan EC_{50} değerleri

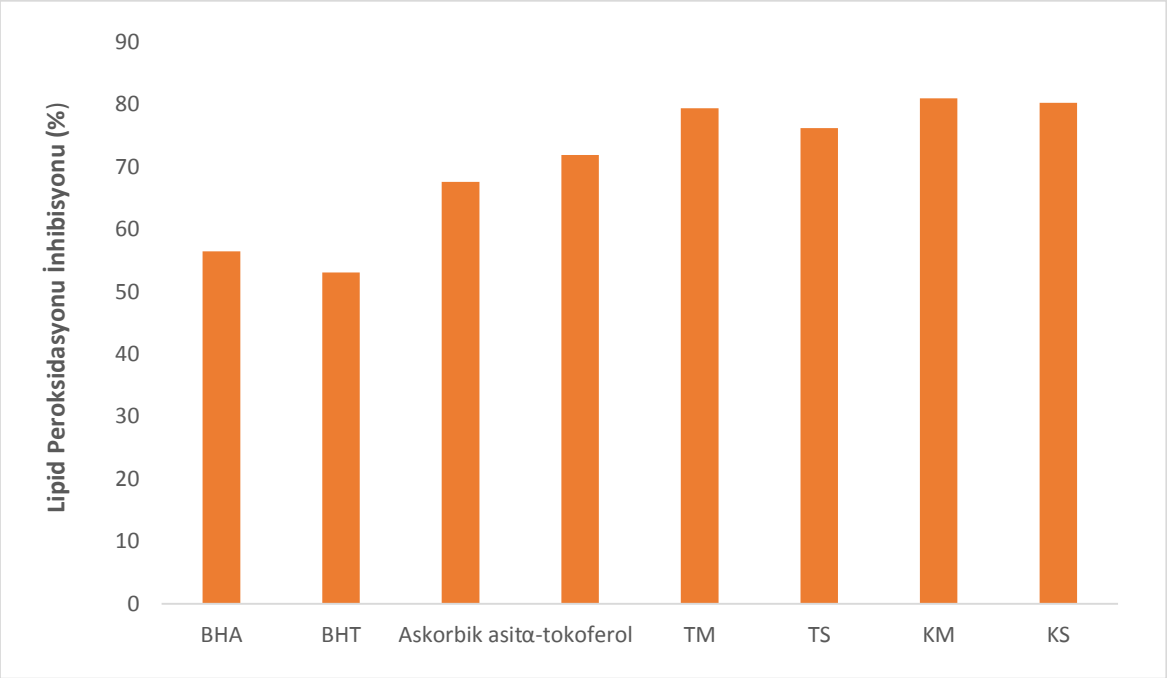
Standart	Askorbik asit
EC_{50}(µg/mL)	0.367±0,090

LİNOLEİK ASİT SİSTEMİNDE FERRİK TİYOSİYANAT (FTC) METODU İLE TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat metodu kullanılarak ekstraktların lipid peroksidasyonunu inhibe etmeleri BHT, BHA, askorbik asit, α-tokoferol standartları kullanılarak değerlendirildi. 12 saatte bir ölçüm alınarak peroksidasyon inhibisyonu 96 saat süreyle takip edildi, kontrolün maksimum absorbans değeri verdiği anlardan hareketle yaprak ekstraktları ve standartların grafikleri çizildi.

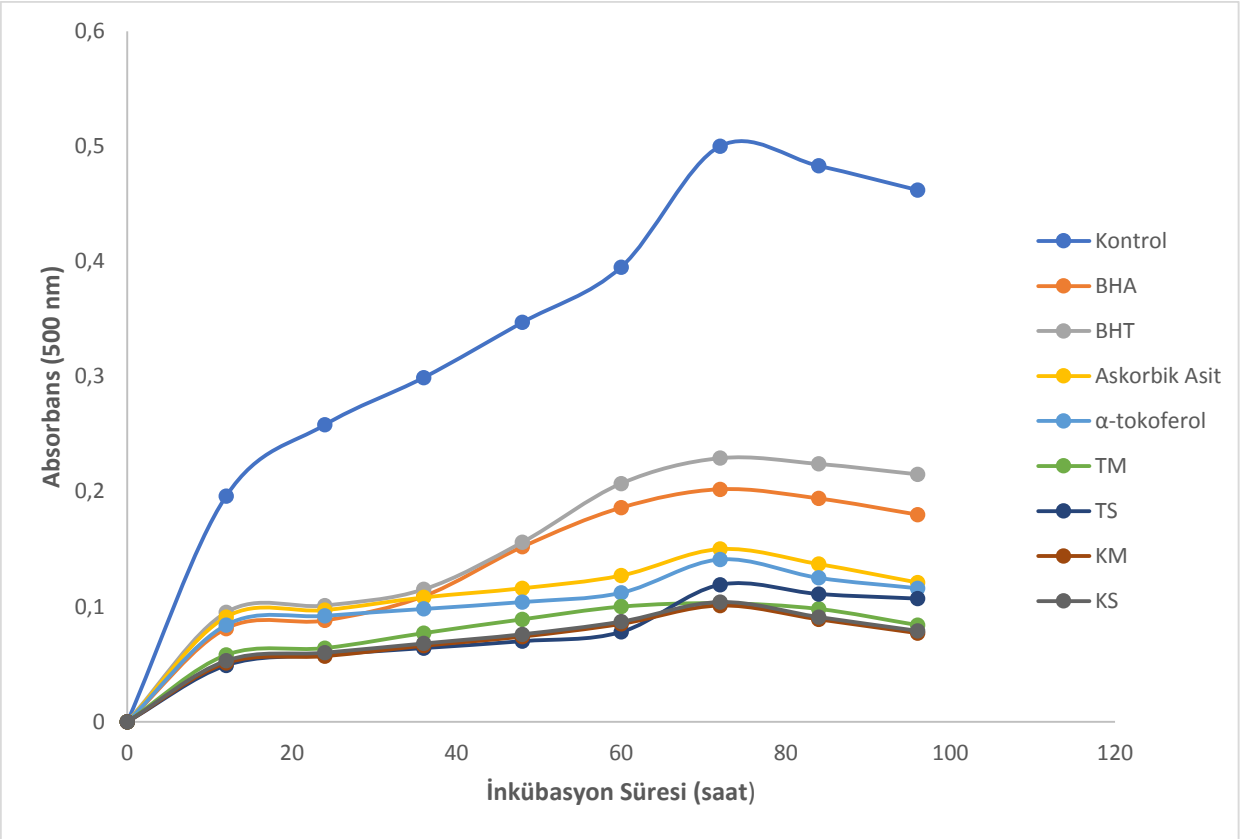


Şekil 32. Labada ekstraktları ve standatların 50 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

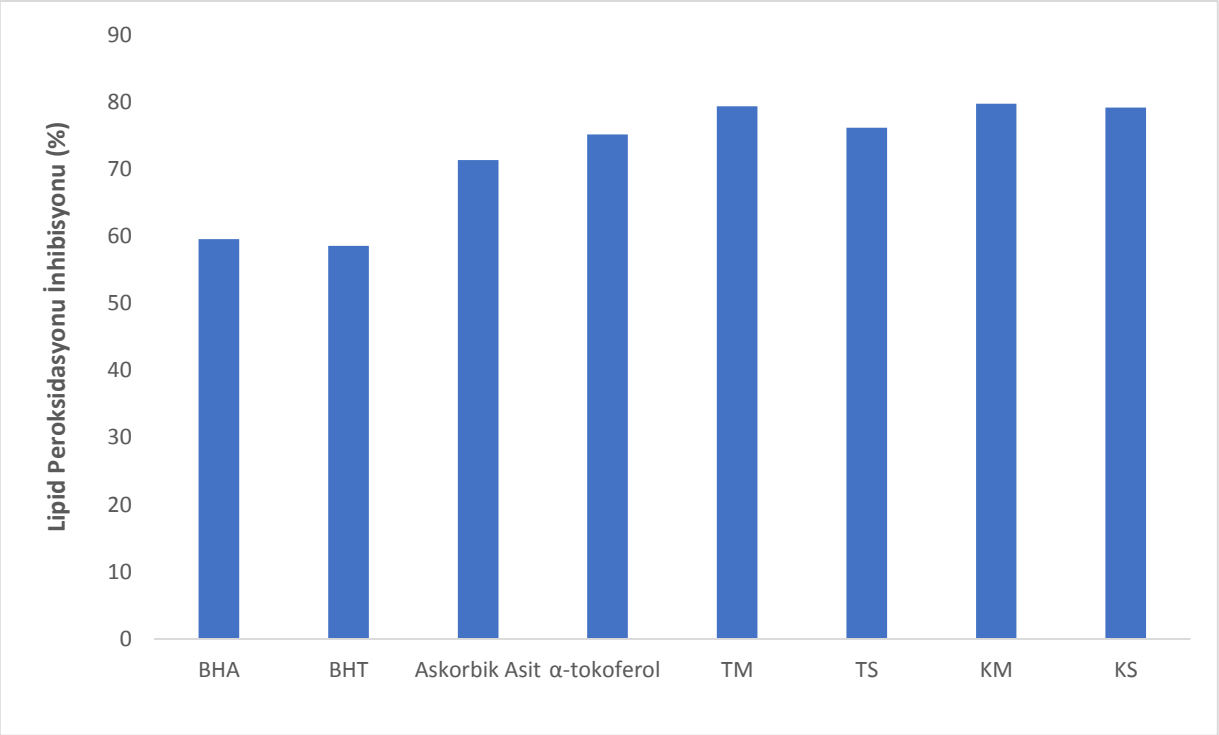


Şekil 33. Labada ekstraktları ve standartların 50 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri

Şekil 33'e göre 50 µg/mL konsantrasyonlarında taze labada yaprağının metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 79.37±0,87 ve 76.20±0,79, kuru labada yaprağının metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 80.96±0,71, 80.28±0,69 olarak bulundu. Standart olarak kullanılan BHA, BHT, askorbik asit, α-tokoferolün 50 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonları sırası ile; 56.47±0,38, 53.07±0,26, 67.58±0,19, 71.89±0,47 olarak tespit edildi.

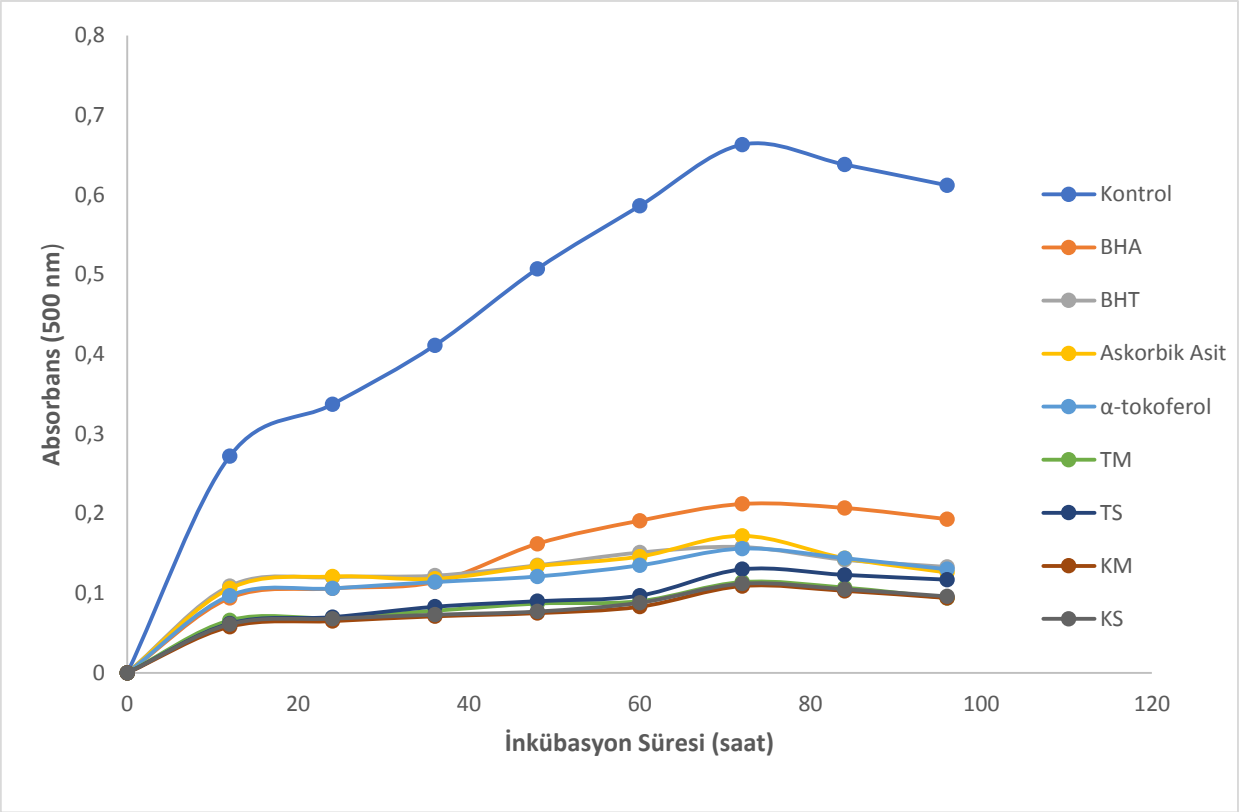


Şekil 34. Labada ekstraktları ve standatların 100 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

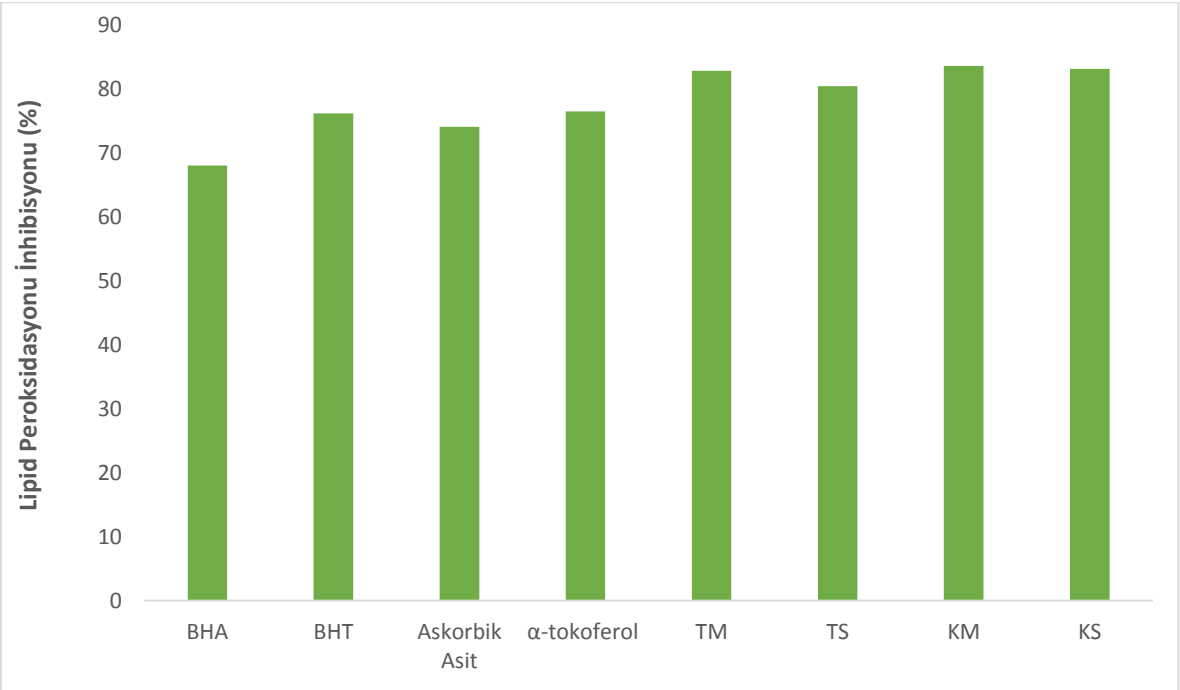


Şekil 35. Labada ekstraktları ve standartların 100 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri

Şekil 35'e göre 100 µg/mL konsantrasyonlarında taze labada yaprağı metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 79.40±0,44 ve 76.20±0,57, kuru labada yaprağı metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 79.80±0,67, 79.20±0,59 olarak bulundu. Standart olarak kullanılan BHA, BHT, askorbik asit, α-tokoferolün 100 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonları sırası ile; 59.60±0,41, 58.60±0,39, 71.40±0,27, 75.20±0,61 olarak belirlendi.

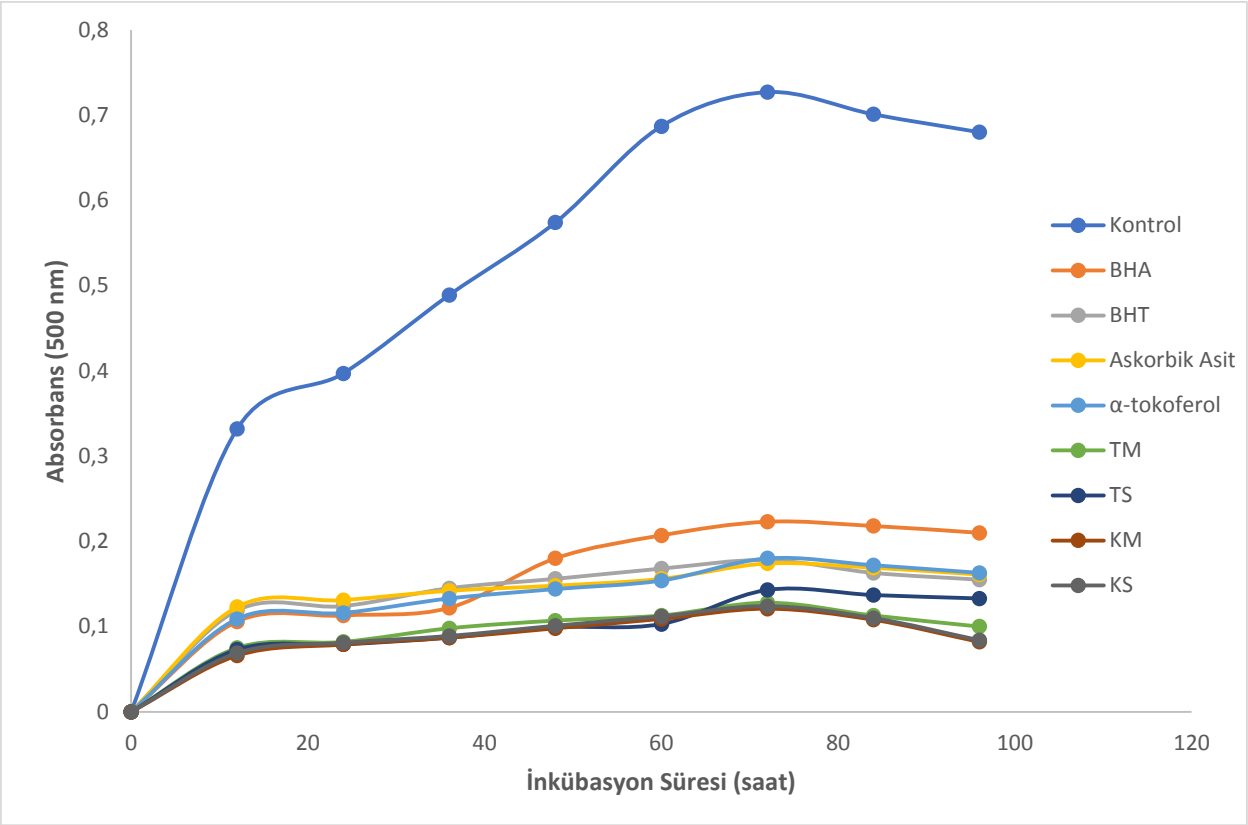


Şekil 36. Labada ekstraktları ve standatların 150 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

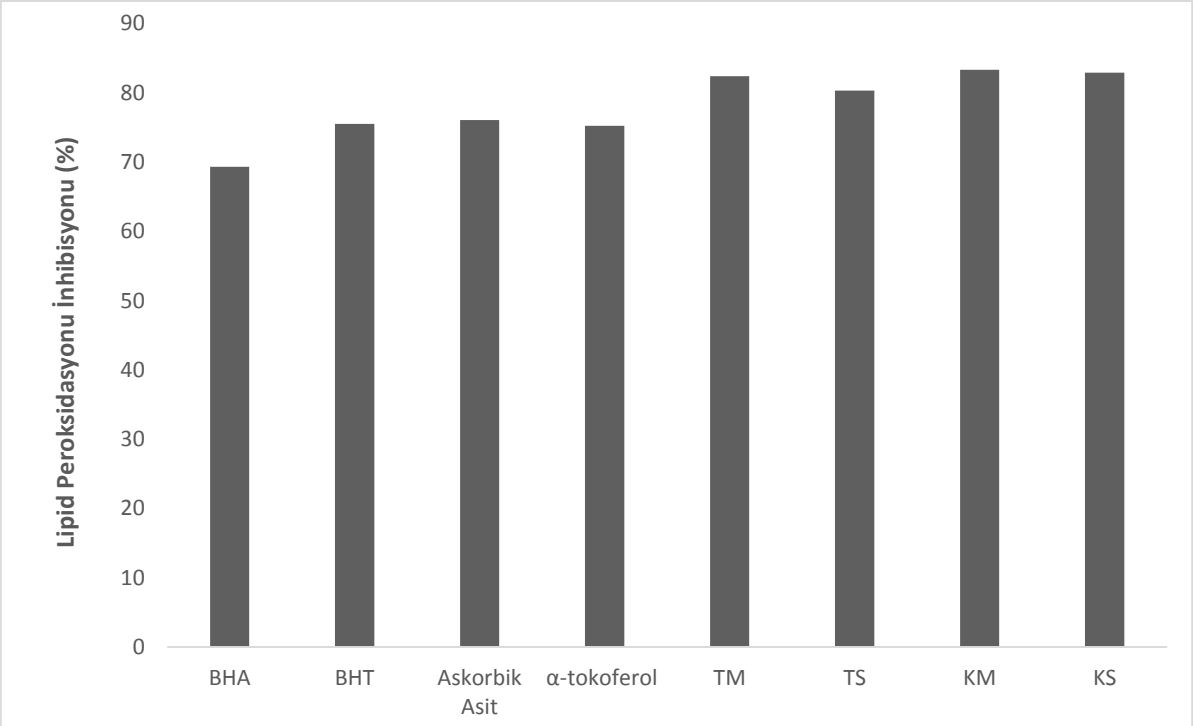


Şekil 37. Labada ekstraktları ve standartların 150 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri

Şekil 37'ye göre 150 µg/mL konsantrasyonlarında taze labada yaprağı metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 82.81±0,51 ve 80.40±0,68, kuru labada yaprağı metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 83,56±0,39, 83.11±0,25 olarak bulundu. Standart olarak kullanılan BHA, BHT, askorbik asit, α-tokoferolün 150 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonları sırası ile; 68.03±0,84, 76.17±0,28, 74.06±0,12, 76.48±0,63 olarak hesaplandı.

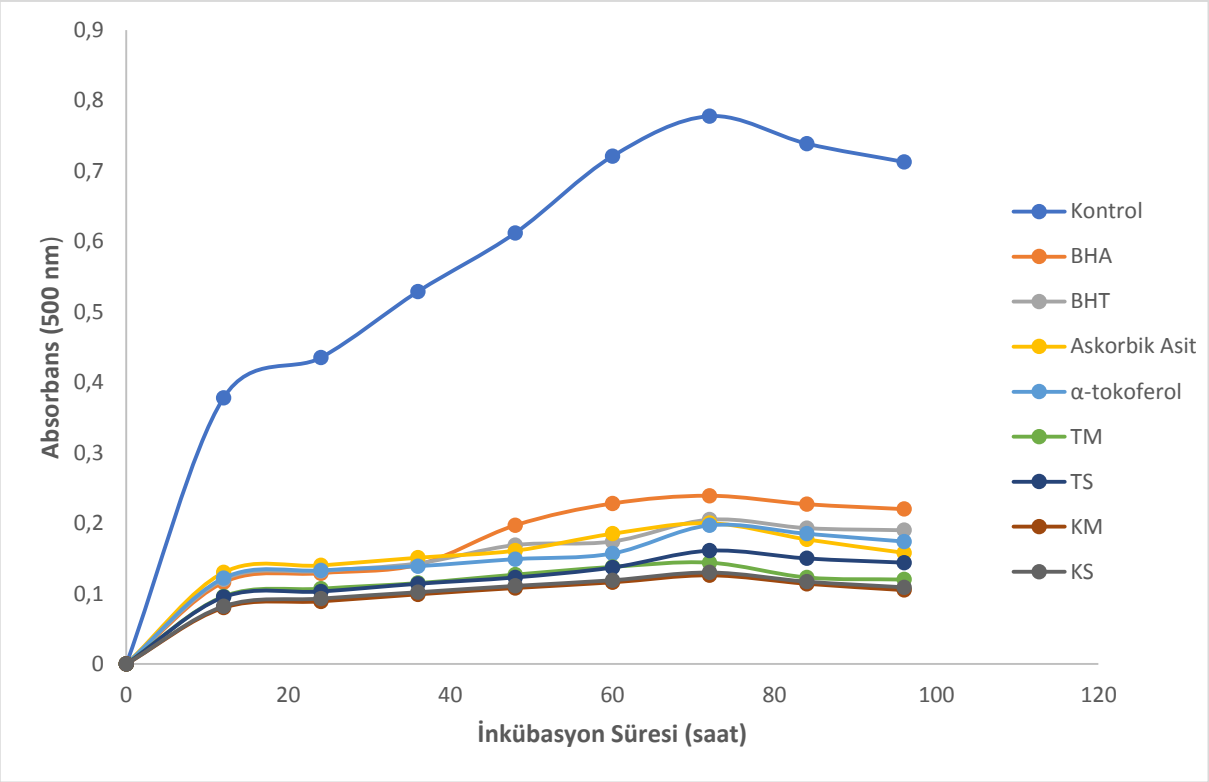


Şekil 38. Labada ekstraktları ve standatların 200 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

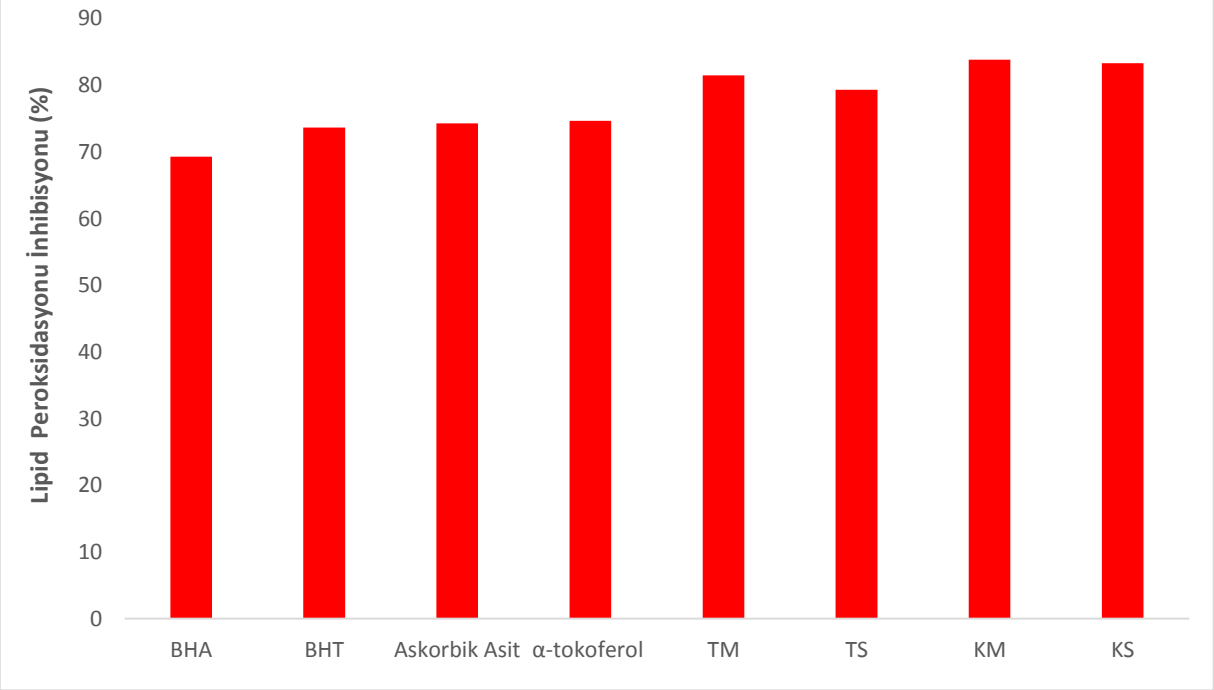


Şekil 39. Labada ekstraktları ve standartların 200 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri

Şekil 39'a göre 200 µg/mL konsantrasyonlarında taze labada yaprağı metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 82.40±0,26 ve 80.34±0,19, kuru labada yaprağı metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 83.36±0,72, 82.95±0,39 olarak bulundu. Standart olarak kullanılan BHA, BHT, askorbik asit, α-tokoferolün 200 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonları sırası ile; 69.33±0,49, 75.52±0,57, 76.07±0,74, 75.25±0,31 olarak tespit edildi.



Şekil 40. Labada ekstraktları ve standatların 250 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonunun zamanla değişimi

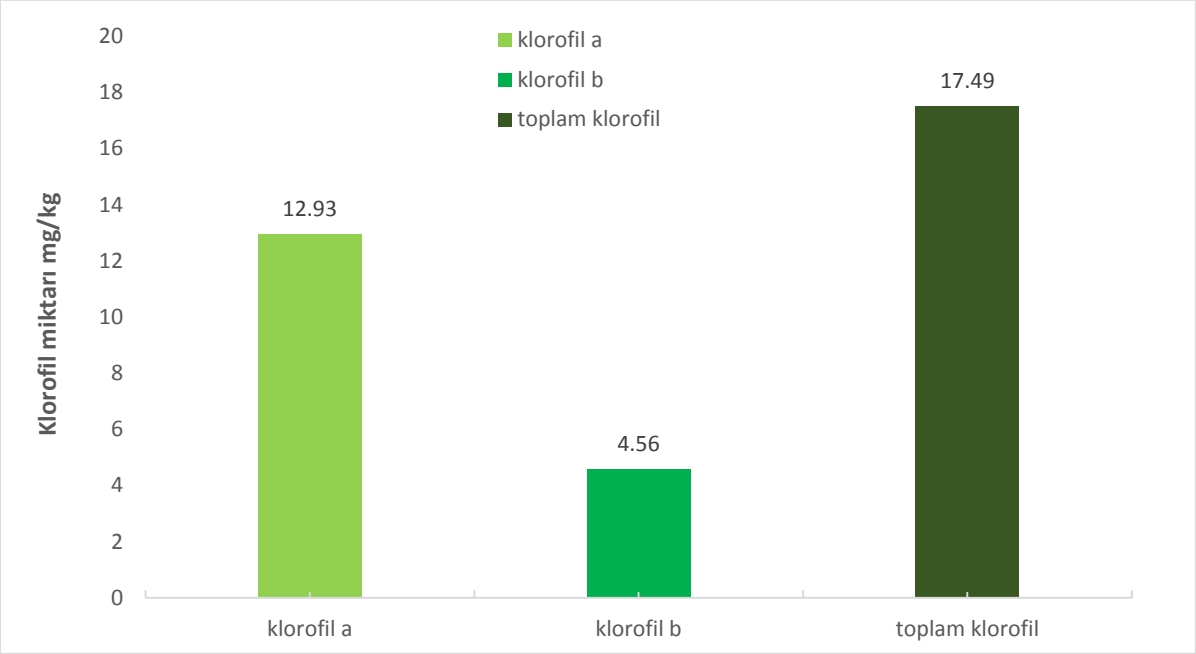


Şekil 41. Labada ekstraktları ve standartların 250 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri

Şekil 41'e göre 250 µg/mL konsantrasyonlarında taze labada yaprağı metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 81.50±0,69 ve 79.31±0,43, kuru labada yaprağı metanol ve su ekstraktlarının lipid peroksidasyonu sırasıyla 83.81±0,50, 83.30±0,76 olarak bulundu. Standart olarak kullanılan BHA, BHT, askorbik asit, α-tokoferolün 250 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonları sırası ile; 69.29±0,14, 73.66±0,34, 74.30±0,21, 74.68±0,54 olarak bulundu.

KLOROFİL TAYİNİ

Labada yaprağının klorofil miktarı yaş ağırlığı esas alınarak mg/kg olarak hesaplandı (Şekil 42).



Şekil 42. Labada yaprağının klorofil miktarları

Labada yaprağının klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarları sırasıyla 12.93 mg/kg, 4.56 mg/kg ve 17.49 mg/kg olarak belirlenmiştir.

KAROTENOİD TAYİNİ

Çalışmada labada yaprağının kuru örneğinin 300 mg ile çalışılmıştır (Şekil 43).



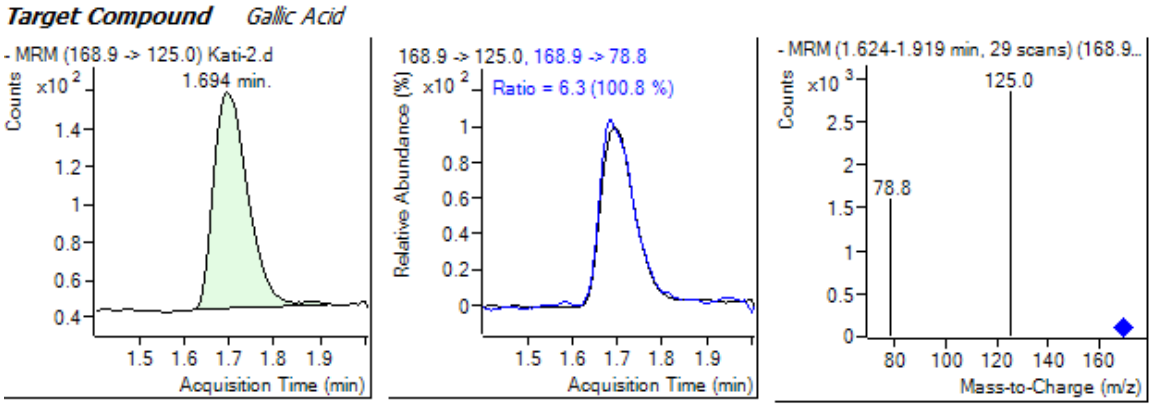
Şekil 43. Labada yaprağının toplam karotenoid içeriği

LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE FENOLİK MADDE ANALİZİ

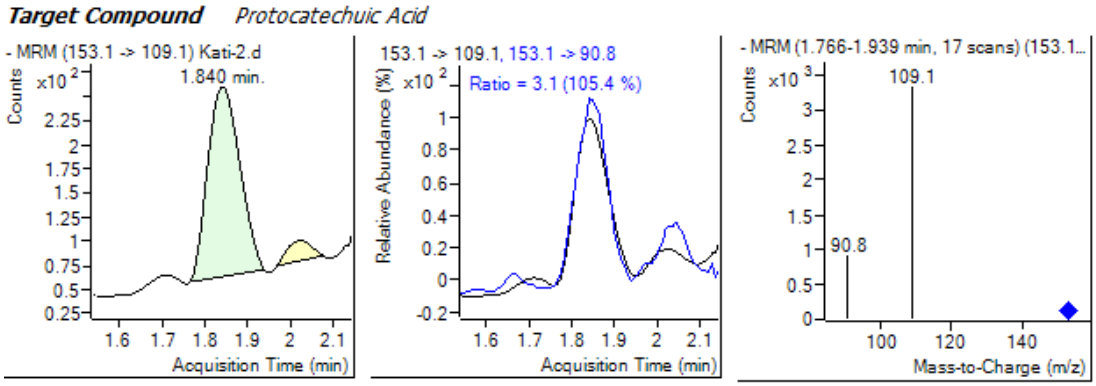
Ekstraktların arasında en yüksek aktiviteye taze labada yaprağının su ekstraktının sahip olmasından dolayı fenolik madde analizinde bu ekstrakt kullanılarak sonuçlar ppb düzeyinde belirlenmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. Taze labada yaprağı ekstraktında bulunan fenolik maddeler ve konsantrasyonları

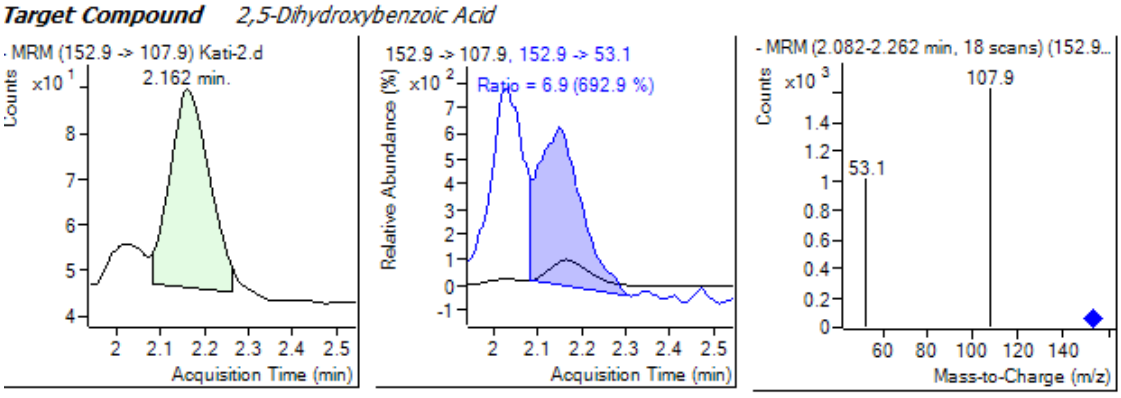
Bulunan Fenolik Maddeler	Konsantrasyon (ppb)
Gallik asit	73,1024
Protokatekuik asit	203,2057
2,5-dihidroksibenzoik asit	81,4790
Kafeik asit	6868,8887
Salisilik asit	17,2674
Siringik asit	166,1959
Trans ferrulik asit	5547,4937
Rutin	12087,0758
p-kumarik asit	812,3711
Kuersetin	24,2114
Absisik asit	601,9718
Jasmonik asit	153,8098
GSH	85,4819
GSSG	126,4699



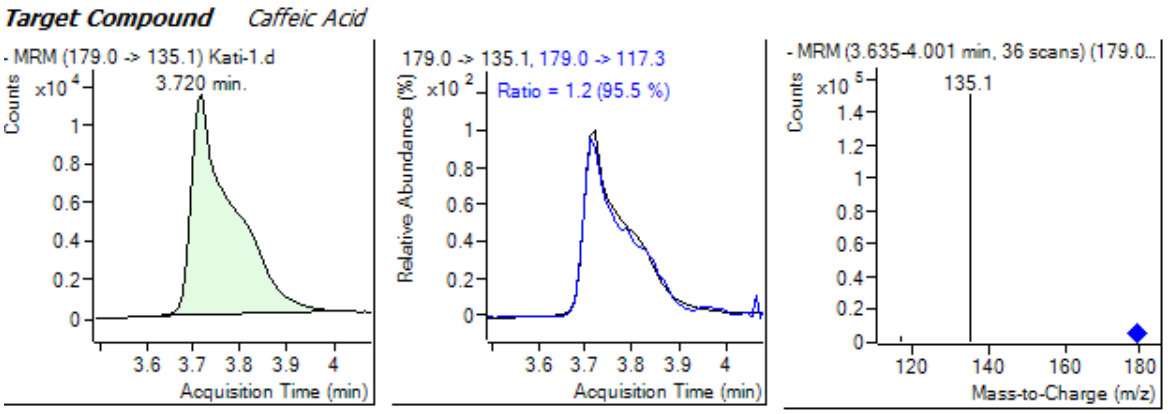
Şekil 44. Taze labada yaprağı ekstraktının gallik asit spektrumu



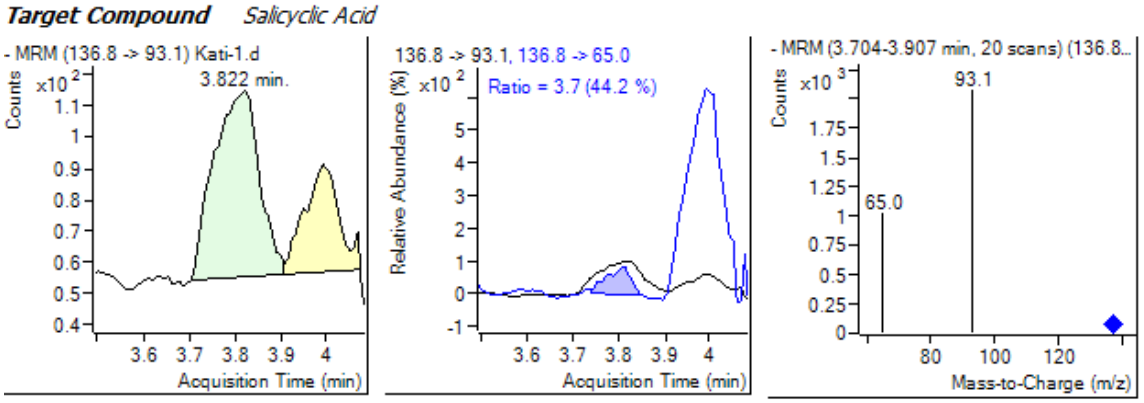
Şekil 45. Taze labada yaprağı ekstraktının protokatekuik asit spektrumu



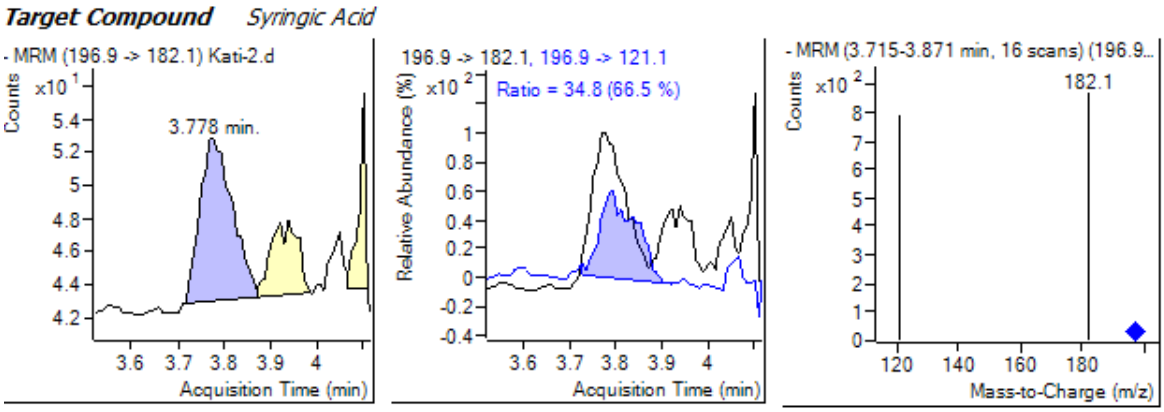
Şekil 46. Taze labada yaprağı ekstraktının 2,5-dihidroksibenzoik asit spektrumu



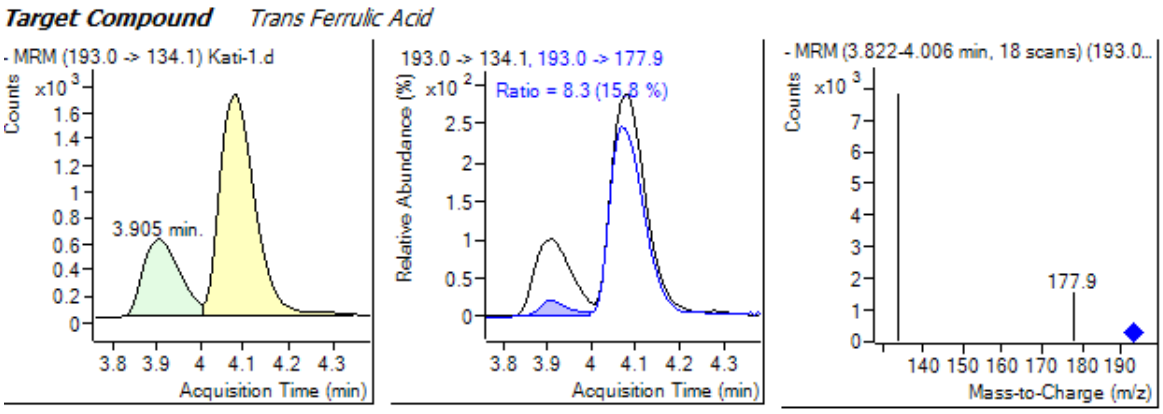
Şekil 47. Taze labada yaprağı ekstraktının kafeik asit spektrumu



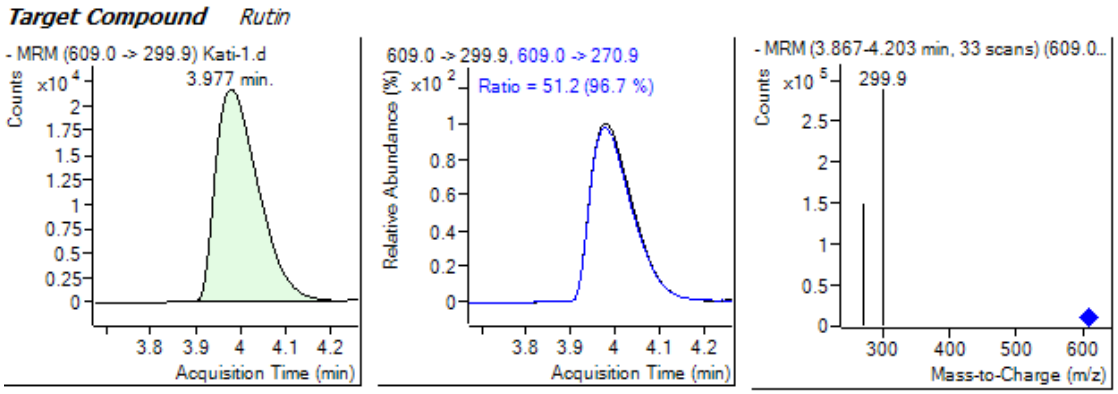
Şekil 48. Taze labada yaprağı ekstraktının salisilik asit spektrumu



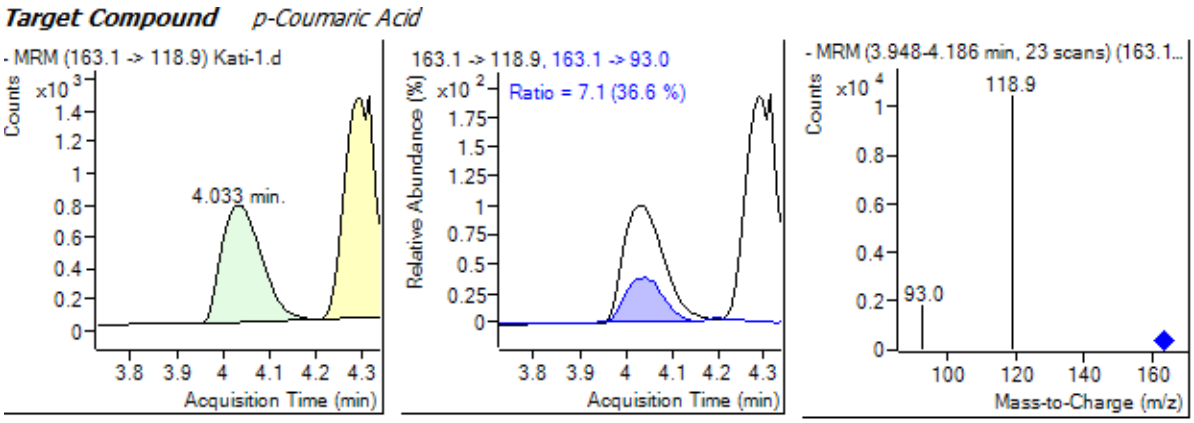
Şekil 49. Taze labada yaprağı ekstraktının siringik asit spektrumu



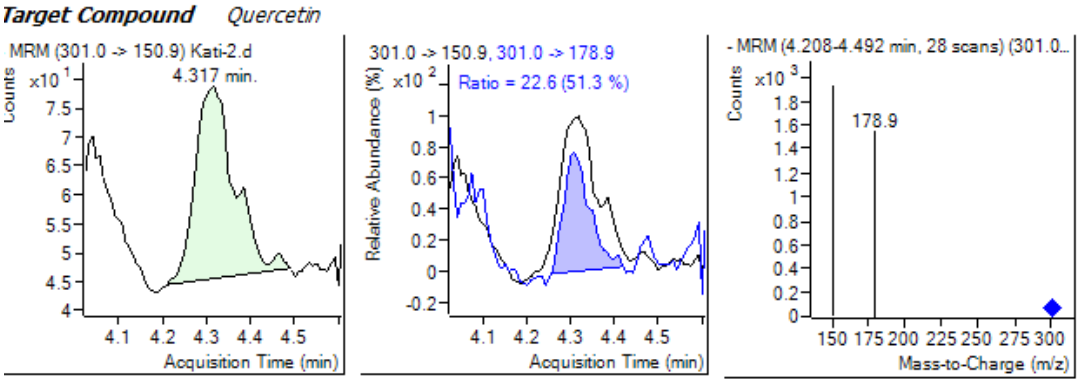
Şekil 50. Taze labada yaprağı ekstraktının trans ferrulik asit spektrumu



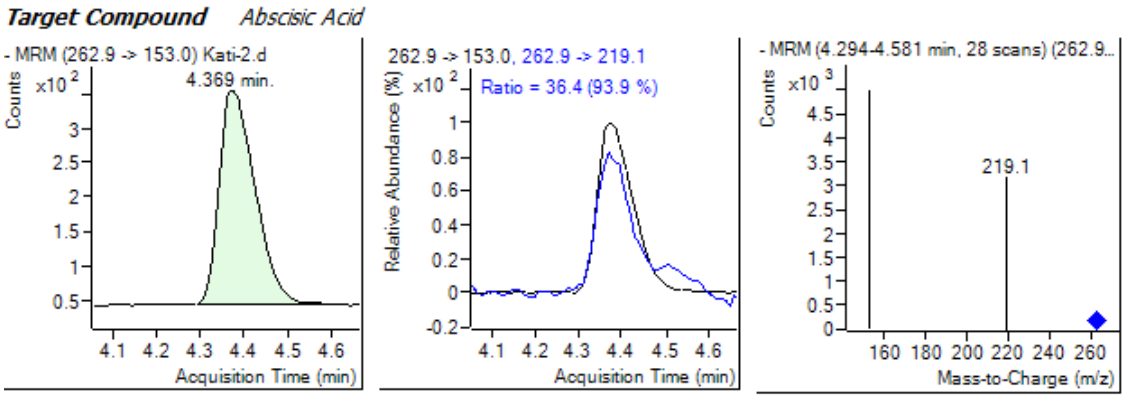
Şekil 51. Taze labada yaprağı ekstraktının rutin spektrumu



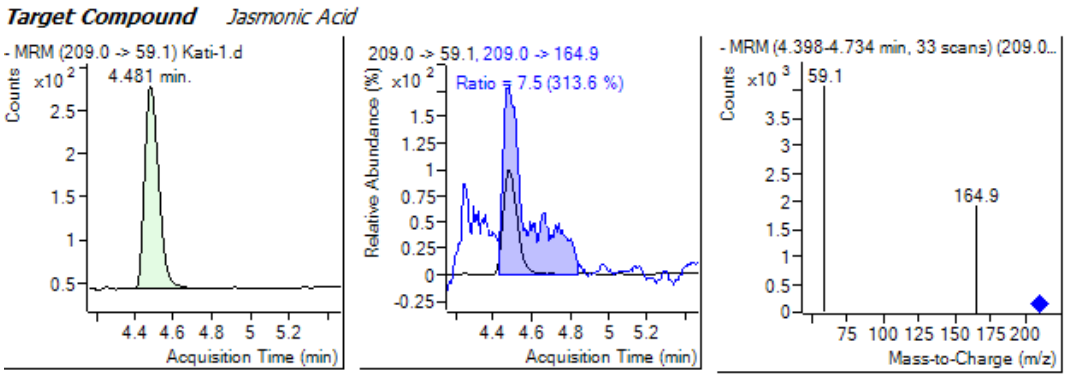
Şekil 52. Taze labada yaprağı ekstraktının *p*-koumarik asit spektrumu



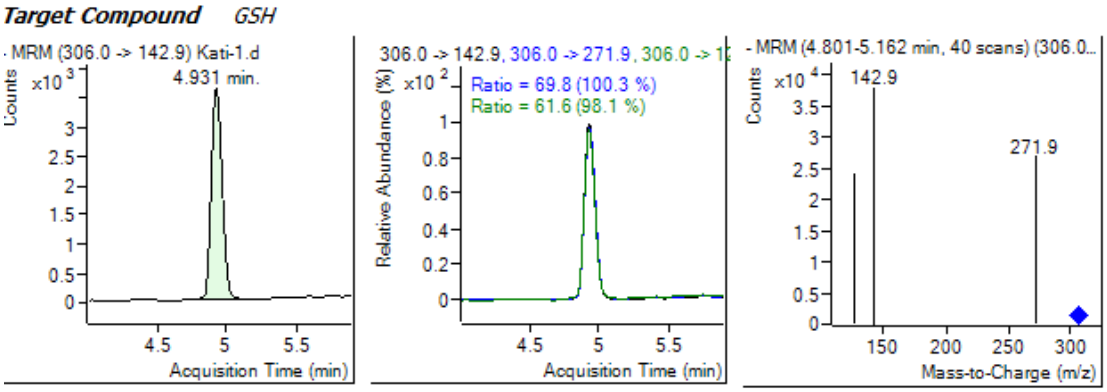
Şekil 53. Taze labada yaprağı ekstraktının kuersetin spektrumu



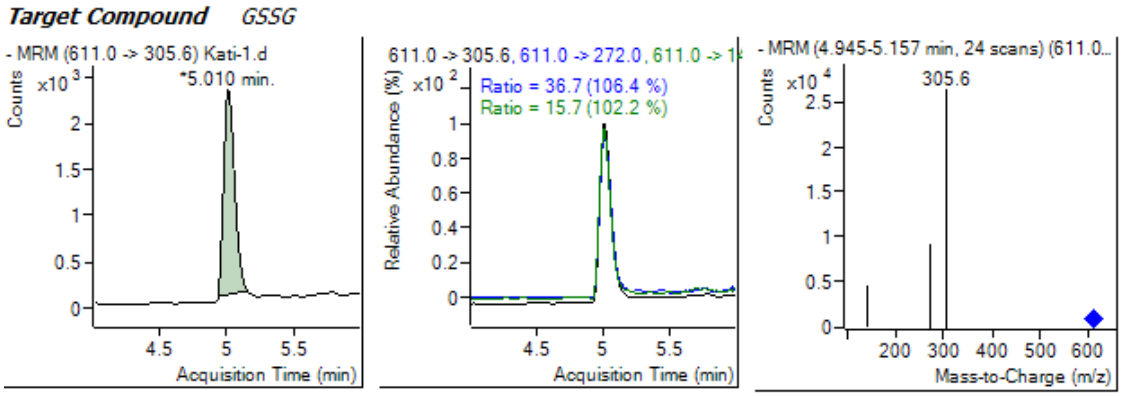
Şekil 54. Taze labada yaprağı ekstraktının absisik asit spektrumu



Şekil 55. Taze labada yaprağı ekstraktının jasmonik asit spektrumu



Şekil 56. Taze labada yaprağı ekstraktının GSH spektrumu



Şekil 57. Taze labada yaprağı ekstraktının GSSG spektrumu

Tablo 17. Taze labada yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin alıkonma süreleri ve m/z değerleri

Pik	Bileşik	Alıkonma süresi	$[M-H]^-_{(m/z)}$
1	Gallik asit	1,694	169
2	Protokatekuik asit	1,840	153
3	2,5-dihidroksibenzoik asit	2,162	153
4	Kafeik asit	3,720	179
5	Salisilik asit	3,822	137
6	Siringik asit	3,778	197
7	Trans ferrulik asit	3,905	193
8	Rutin	3,977	609
9	p-kumarik asit	4,033	163
10	Kuersetin	4,317	301
11	Absisik asit	4,369	263
12	Jasmonik asit	4,481	209
13	GSH	4,931	306
14	GSSG	5,010	611

TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında labada (*Rumex patientia* L.*)* yapraklarının taze ve kuru örneklerinde su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarları ile ekstraktların toplam antioksidan aktiviteleri çeşitli metotlar kullanılarak belirlenmiştir.

Taze labada yapraklarından elde edilen su ekstraktının ekstraksiyon verimi 48.04 mg/g, metanol ekstraktının ekstraksiyon verimi ise 58.38 mg/g olarak bulundu. Kuru labada yapraklarından elde edilen su ekstraktının ekstraksiyon verimi 52.8 mg/g, metanol ekstraktının ekstraksiyon verimi ise 150.26 mg/g olarak bulundu.

En yüksek ekstraksiyon veriminin kuru labada yapraklarının metanol ekstraktında olduğu gözlemlendi.

TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK (TPC) TAYİNİ

Şekil 16' ya göre bu çalışmada fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden taze labada yapraklarının metanol ve su ekstraktlarının sırası ile; 26.94±0,91 mg/g ve 36.16±0,65 mg/g, kuru labada yapraklarının metanol ve su ekstraktlarının sırası ile; 25.38±0,72 mg/g ve 23.94±0,81 mg/g ekstrakt olduğu tespit edildi. Labada yapraklarının fenolik bileşik içerikleri gallik asit eşdeğeri cinsinden taze-su>taze-metanol>kuru-metanol>kuru-su şeklinde azalma göstermektedir.

Şekil 17'ye göre fenolik madde miktarları pirokateşol eşdeğeri cinsinden taze labada yapraklarının metanol ve su ekstraktlarının sırası ile; 16.77±0,96 mg/g ve 22.70±0,94 mg/g, kuru labada yapraklarının metanol ve su ekstraktlarının sırası ile; 15.76±0,47 mg/g ve 14.84±0,48 mg/g ekstrakt olduğu tespit edildi.

Labada yapraklarının fenolik bileşik içerikleri pirokateşol eşdeğeri cinsinden taze-su>taze-metanol>kuru-metanol>kuru-su şeklinde azalma göstermektedir.

Şat ve Öz (2015) tarafından yapılan bir araştırmada gallik asit ekivalenti cinsinden ıspanak ve pazı yapraklarının su ekstraktında bulunan toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 51.83 mg GAE/100 g ve 56.06 mg GAE/100 g olarak belirlenmiştir (44).

Ay ve Yavaşoğlu (2017) çalışmalarında tere yaprağının metanol ekstraktında bulunan toplam fenolik madde içeriğini 853.88 mg ferrulik asit/100 g olarak tespit etmişlerdir (45).

TOPLAM FLAVONOİD İÇERİĞİNİN TAYİNİ

Şekil 20'ye göre bu çalışmada flavonoid madde içerikleri gallik asit eşdeğeri cinsinden taze labada yaprağının metanol ve su ekstraktlarının sırasıyla; 31.55±0,84 mg/g, 49.15±0,29 mg/g, kuru labada yaprağının metanol ve su ekstraktlarının sırasıyla; 21.05±0,74 mg/g, 26.65±0,14 mg/g ekstrakt olduğu belirlendi.

Labada yapraklarındaki flavonoid madde içeriklerinin gallik asit eşdeğeri cinsinden taze-su>taze-metanol>kuru-su>kuru-metanol şeklinde azalma gösterdiği belirlendi. Şekil 21'e göre flavonoid madde içerikleri kuersetin eşdeğeri cinsinden taze labada yapraklarının metanol ve su ekstraktlarının sırasıyla; 11.41±0,26 mg/g, 17.70±0,55 mg/g, kuru labada yapraklarının metanol ve su ekstraktlarının sırasıyla; 7.66±0,173 mg/g, 9.66±0,19 mg/g ekstrakt olduğu bulundu.

Labada yapraklarının flavonoid madde içeriklerinin kuersetin eşdeğeri cinsinden taze-su>taze-metanol>kuru-su>kuru-metanol şeklinde azalma gösterdiği belirlendi.

Bunea vd. (2008) çalışmalarında ıspanak yapraklarının flavonoid madde içeriğini 208.89±30.4 mg/100g olarak belirlemişlerdir (46).

Yanardağ ve Kahraman (2009) tarafından yapılan bir araştırmada labada yapraklarının flavonoid madde içeriğinin kateşin ekivalenti cinsinden 290.69±30.64 µg/mL olduğu bildirilmiştir (47).

DEMİR (II) İYONLARINI ŞELATLAMA AKTİVİTESİ

Şekil 22'de labada yaprağı ekstraktları ve standartların metal iyonlarını şelatlama aktiviteleri gösterilmiştir. Taze labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla 37.30±0,538, 39.10±0,77, 42.00±0,88, 46.30±0,59, 49.90±0,19 olarak, su ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla 50.11±0,35, 51.30±0,17, 53.80±0,44, 56.40±0,01, 60.50±0,11 olarak belirlenmiştir. Kuru labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla 39.50±0,25, 44.00±0,37, 46.00±0,38, 48.60±0,329, 52.30±0,07 olarak, su ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında metal şelatlama aktivitesi sırasıyla 42.50±0,36, 46.20±0,01, 49.30±0,10, 51.00±0,28, 54.20±0,02 olarak bulunmuştur.

Taze labada yaprağının su esktraktının 60.50±0,11 ile ekstraktlar arasında en yüksek Fe^{+2} şelatlama aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Güngören ve Saydam (2017) tarafından yapılan çalışmada semizotu örneğinin 3 farklı derişimde (0.2, 0.6 ve 1.0 mg/mL) Fe^{+2} iyonlarını şelatlama aktivitesi aseton, etanol ve su ekstraktlarında sırasıyla 0.61±0,07 ile 34.11±1,30 aralığında, 0.37±0,06 ile 59.86±0,03 aralığında ve 3.98±0,26 ile 87.61±2,41 aralığında olduğu belirlenmiştir (48).

DPPH• RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Şekil 23' e göre konsantrasyon artışı ile radikal giderme aktivitesi de artış göstermiştir. Taze labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla 15.00±0,27, 17.30±0,15, 20.00±0,33, 22.10±0,26, 23.70±0,42 olarak, su ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla 22.40±0,04, 25.10±0,35, 26.30±0,06, 27.10±0,28, 28.90±0,67 olarak tespit edildi. Kuru labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla 19.20±0.72, 20.80±0,48, 22.00±0,35, 23.80±0,77, 26.70±0,12 olarak, su ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri sırasıyla 21.20±0,56, 22.80±0,83, 24.80±0,64, 25.10±0,62, 26.20±0,93 olarak belirlendi.

Lone ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada labada yaprağının etanol ekstraktı için %DPPH radikali giderme aktiviteleri 5, 10, 25 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda sırasıyla

%72.4, %43.0 ve %12.5 olarak bulunmuştur. 50µg/mL konsantrasyonda aktivite göstermediği saptanmıştır (49).

Yıldırım ve Mavi (2001) çalışmalarında *Rumex crispus* cinsi kıvırcık labada yaprağının %DPPH radikali giderme aktivitesini su ve etanol ekstraktlarında sırasıyla %12.0 ve %4.0 olarak bildirmiştir (50).

Güngören ve Saydam (2017) tarafından yapılan çalışmada semizotu yaprağının aseton, etanol ve su ekstraktlarında en yüksek %DPPH radikali giderme aktivitelerinin sırasıyla 56.24±1.98, 53.01±0,26 ve 58.05±1.35 olduğunu saptanmıştır (48).

H_2O_2 GİDERME AKTİVİTESİ

Şekil 24'te görüldüğü üzere; labada yaprağı ekstraktları ve standartların H_2O_2 giderme aktiviteleri konsantrasyon artışı ile azalmıştır. Ekstraktlar arasında en yüksek aktiviteyi 50 µg/mL konsantrasyonda taze labada yaprağının su ekstraktı (60.00±0,43) göstermiştir. Standartlar arasında ise en yüksek radikal giderme aktivitesini 50 µg/mL konsantrasyonda BHT (83.96±0,03) göstermiştir.

Demir ve Nadaroğlu (2008) çalışmalarında kapari yaprağının H_2O_2 giderme aktivitesini su ekstraktında %75.0 olarak belirlemişlerdir (51).

Türkoğlu ve ark. (2014) çalışmalarında beyaz dut ağacı yaprağının 100 µg/mL konsantrasyonda etanol ekstraktında H_2O_2 giderme aktivitesini %64.0 olarak bildirmişlerdir (52).

TOPLAM FERRİK İYONLARINI (Fe^{+3}) İNDİRGEME KAPASİTESİNİN TAYİNİ

Şekil 25'te labada yaprağı ekstraktları ve standartların toplam ferrik iyonlarını indirgeme kapasiteleri gösterilmiştir. Buna göre indirgeme kapasitesinin konsantrasyona bağımlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Taze labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.071±0,018, 0.079±0,007, 0.086±0,003, 0.091±0,009, 0.097±0,014 olarak, su ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.037±0,021, 0.043±0,015, 0.058±0,001, 0.067±0,010, 0.075±0,024 olarak tespit edildi. Kuru labada yaprağının metanol ekstraktının

50-250 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.066±0,016, 0.076±0,007, 0.080±0,002, 0.090±0,008, 0.093±0,012 olarak, su ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri sırasıyla 0.026±0,020, 0.037±0,008, 0.048±0,003, 0.057±0,011, 0.063±0,017 olarak tespit edildi.

Ekstraktların toplam ferrik iyonlarını indirgeme kapasiteleri arasında taze-metanol>kuru-metanol>taze-su>kuru-su, standartlar arasında ise BHA>Askorbik asit>α-tokoferol>BHT sıralaması olduğu gözlenmiştir.

Yıldırım vd. (2001) *Rumex crispus* cinsi kıvırcık labada yapraklarının 500 µg/mL konsantrasyonundaki su ve etanol ekstraktlarının absorbanslarını sırasıyla 0.130 ve 0.158 olarak belirlemişlerdir (50).

SÜPEROKSİT ANYON RADİKALİNİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Şekil 26' da labada yaprağı ekstraktları ve standartların süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri gösterilmiştir. Konsantrasyon artışı ile beraber radikal giderme aktivitesinde de bir artış gözlenmiştir.

Taze labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 23.00±0,32, 24.00±0,37, 24.90±0,68, 26.10±0,29, 28.60±0,33, su ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 24.60±0,38, 25.90±0,69, 28.00±0,31, 30.00±0,35, 32.00±0,34 olarak tespit edildi. Kuru labada yaprağının metanol ekstraktının 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 20.10±0,047, 21.00±0,17 22.60±0,57, 25.00±0,18, 27.00±0,20, su ekstraktının ise 50-250 µg/mL konsantrasyonlarında süperoksit anyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 23.60±0,22, 25.70±0,31, 27.20± 0,29, 28.40±0,01, 29.20±0,28 olarak bulundu.

Yeşiloğlu ve Gülen (2013) tarafından yapılan çalışmada asma yapraklarının 50 ve 125 µg/mL konsantrasyonlarındaki su ekstraktlarının 11.07±1.20 ve 18.25±1.38, metanol ekstraktlarının 16.80±0,52 ve 9.25±0,52 oranlarında süperoksit anyon radikali oluşumu üzerine giderme aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (53).

ABTS•+ RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Şekil 27'de labada yaprağı ekstraktları ve standartların ABTS•+ radikalini giderme aktiviteleri gösterilmiştir. ABTS•+ radikalini giderme aktiviteleri karşılaştırıldığında ekstraktların; kuru-su>taze-su>kuru-metanol>taze-metanol sıralamasında, standartların ise α-tokoferol>askorbik asit>BHA>BHT sıralamasında azalan giderme aktivitesi belirlenmiştir.

ABTS•+ radikali için EC_{50} değerleri hesaplanmış olup, taze labada yaprağının metanol ekstraktının 13.25±0,28, su ekstraktının 10.85±0,55 ve kuru labada yaprağının metanol ekstraktının 12.65±0,60, su ekstraktının 10.12±0,50 değere sahip olduğu belirlenmiştir. Standartların EC_{50} değerleri ise BHA, BHT, α-tokoferol, askorbik asit için sırası ile; 15.34±0,75, 14.96±0,36, 14.20±0,40, 15.25±0,30 olarak tespit edilmiştir.

Mantle vd. (2000) çalışmalarında kuzukulağı yaprağının ABTS•+ radikali giderme aktivitesini troloks ekivalenti cinsinden 0.88 mmol/g kuru ağırlık olarak belirlemişlerdir (54).

FOSFOMOLİBDEN METODU İLE TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde 50-250 µg/mL aralığında konsantrasyon artışı ile antioksidan aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Standart olarak kullanılan α-tokoferol ve ekstraktların antioksidan aktiviteleri arasında α-tokoferol>taze-su>taze-metanol>kuru-metanol>kuru-su sıralaması gözlenmiştir.

Yeşiloğlu ve Engin (2018) yapmış olduğu çalışmada mürver yapraklarının 75-375 µg/mL konsantrasyonlarındaki metanol ekstraktlarında antioksidan kapasiteyi bu yöntemle 16.79 mg/g, 17.31 mg/g, 33.79 mg/g, 39.36 mg/g ve 41.82 mg/g olarak bulmuştur (55).

HİDROKSİL RADİKALİ GİDERME AKTİVİTESİ

Şekil 32'te görüldüğü üzere en yüksek hidroksil radikali giderme aktivitesini 250 µg/mL konsantrasyonda standart olarak kullanılan BHT göstermiştir. Standart ve ekstraktlar arasında ise BHT>taze-su>kuru-metanol>taze-metanol>kuru-su yönünde radikal giderme aktivitesi sıralaması gözlenmiştir.

Başak ve Candan (2008) *Lallementia canescens* L. fisch & mey bitkisinin ve kallus doku kültürünün hidroksil radikalini giderme aktivitelerini sırası ile bitki metanol özütü>taze bitki> kallus doku kültürü>kültür metanol özütü şeklinde belirlemişlerdir (57).

BAKIR İYONLARINI İNDİRGEME POTANSİYELİ (CUPRAC METODU)

Şekil 33'te görüldüğü gibi bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli konsantrasyona bağımlıdır. 250 μg/mL konsantrasyonda hazırlanan labada yaprağı ekstraktları ve askorbik asit standartının bakır iyonlarını indirgeme potansiyelleri arasında askorbik asit>taze-su>taze-metanol>kuru-su>kuru-metanol sıralaması gözlenmiştir.

Apak vd. (2008) çalışmalarında kafeik asit ve klorojenik asit için bakır iyonlarını indirgeme potansiyelini sırasıyla %2.89 ve %2.47 olarak bildirmişlerdir (58).

Karagözler ve Yavaşer (2011) Vitamin A, Vitamin C ve Vitamin E ile yapmış oldukları çalışmada bu vitaminlerin bakır iyonlarını indirgeme potansiyellerini sırasıyla 2.147±0.056, 1.471±0.140 ve 1.294±0.043 olarak belirlemişlerdir (59).

LİNOLEİK ASİT SİSTEMİNDE FERRİK TİYOSİYANAT (FTC) METODU İLE TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

Şekil 35'te görüldüğü üzere 50 μg/mL konsantrasyonda labada yaprağı ekstraktları ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri arasında kuru-metanol>kuru-su>taze-metanol>taze-su>α-tokoferol>askorbik asit>BHA>BHT sıralaması gözlenmiştir.

Şekil 37'te görüldüğü üzere 100 μg/mL konsantrasyonda labada yaprağı ekstraktları ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri arasındaki sıralama kuru-metanol>taze-metanol>kuru-su>taze-su>α-tokoferol>askorbik asit>BHA>BHT şeklindedir.

Şekil 39'a göre 150 μg/mL konsantrasyonda labada yaprağı ekstraktları ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme sıralaması kuru-metanol>kuru-su>taze-metanol>taze-su>α-tokoferol>askorbik asit>BHT>BHA şeklindedir.

Şekil 41'te görüldüğü üzere 200 μg/mL konsantrasyonda labada yaprağı ekstraktları ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri arasında kuru-metanol>kuru-su>taze-metanol>taze-su>askorbik asit>BHT>α-tokoferol>BHA sıralaması gözlenmiştir.

Şekil 43'te görüldüğü gibi 250 μg/mL konsantrasyonda labada yaprağı ekstraktları ve standartların lipid peroksidasyonunu inhibe etme sıralaması kuru-metanol>kuru-su>taze-metanol>kuru-metanol>α-tokoferol>askorbik asit>BHT>BHA şeklinde belirlenmiştir.

Şekillerden de anlaşılacağı üzere 50-250 μg/mL konsantrasyon aralığında kuru labada yaprağının metanol ekstraktının lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdesi en yüksektir.

Karagözler ve Yavaşer (2011) yapmış oldukları çalışmada gallik asit ve kuersetin doğal antioksidanlarının lipid peroksidasyonunu inhibe etme miktarlarını 33.42±3.11 ve 92.91±0,40 olarak belirlemişlerdir (59).

KLOROFİL TAYİNİ

Şekil 30'a göre taze labada yapraklarının klorofil miktarı klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil türünden 12.93 mg/kg, 4.56 mg/kg ve 17.49 mg/kg yaş ağırlık olarak tespit edilmiştir.

Yeşiloğlu ve Gülen (2013) çalışmalarında yonca yapraklarının klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriklerini sırasıyla 8.89±0.82, 3.82±0.55 ve 12.71±1,36 mg/kg yaş ağırlık olarak tespit etmişlerdir (53).

KAROTENOİD TAYİNİ

Şekil 31'e göre kurutulmuş labada yapraklarının toplam karotenoid içeriği %10.82 olarak belirlenmiştir.

Yıldıztekin ve Tuna (2015) yapmış oldukları çalışmalarında yonca yapraklarının karotenoid miktarını 22.34 µg/g YA olarak bildirmişlerdir (56).

LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE FENOLİK MADDE ANALİZİ

Taze labada yaprağının su ekstraktının LC-MS/MS yöntemi ile fenolik madde analizi yapılmıştır. Şekil 44-57 'de bu maddelerin spektrumları gösterilmiştir. Tablo 16'da görüldüğü üzere taze labada yaprağı ekstraktında bulunan fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, kafeik asit, salisilik asit, siringik asit, trans ferrulik asit, rutin, *p*-koumarik asit, kuersetin, absisik asit, jasmonik asit, GSH ve GSSG'dir. Bunlar arasında analizler sonucu en yüksek konsantrasyonu rutin (12087,0758 µg/kg), en düşük konsantrasyonu ise salisilik asit (17,2674 µg/kg) göstermiştir.

Taze labada yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin konsantrasyonları analiz sonucunda büyükten küçüğe doğru rutin>kafeik asit>trans ferrulik asit>*p*-koumarik asit>absisik asit>protokatekuik asit>siringik asit>jasmonik asit>GSSG>GSH>2,5-dihidroksi benzoik asit>gallik asit>quersetin>salisilik asit sıralaması olduğu belirlenmiştir.

Yeşiloğlu ve Engin (2018) yapmış oldukları çalışmada mürver meyvesinin içerdiği fenolik maddelerin trans *p*-kumarik asit, kateşin, siringik asit, salisilik asit, trans sinapik asit olduğunu tespit etmişlerdir (55).

SONUÇLAR

Biyolojik sistemler serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin verdiği hasara karşı koruyucu sistemler içerirler. Bu sistemler antioksidanlar olarak adlandırılmakta, vücudu başta kanser olmak üzere nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara karşı korumakta, DNA mutasyonlarını önlemektedirler.

Bu tez çalışmasında Trakya bölgesinde yetiştirilen labada yaprağının taze ve kurutulmuş örneklerinin içerdikleri antioksidan aktivitenin incelenmesi ve literatüre kazandırılması amaç edinilmiştir.

Toplam fenolik bileşik tayininde gallik asit ve pirokateşol standartları kullanıldı. Gallik asit ve pirokateşol kullanılarak standart grafikler sırası ile; y=0,0009x-0,0025 ve y=0,0014x+0,0052 olarak belirlendi. Gallik asit eşdeğeri olarak en yüksek fenolik bileşik miktarına taze labada yaprağının su ekstraktının (36.16±0,65 mg GAE/g) sahip olduğu bulundu. Pirokateşol eşdeğeri olarak da en yüksek fenolik bileşik miktarına yine taze labada yaprağının su ekstraktının (22.70±0,94 mg PKE/g) sahip olduğu tespit edildi.

Toplam flavonoid içeriğinin tayininde gallik asit ve kuersetin standart olarak kullanıldı. Gallik asit ve kuersetin kullanılarak standart grafiklerin sırası ile; y=0,001x+0,0005 ve y=0,0028x-0,0036 olduğu bulundu. Gallik asit eşdeğeri olarak en yüksek flavonoid içeriğine taze labada yaprağının su ekstraktının (49.15±0,29 mg GAE/g) sahip olduğu belirlendi. Kuersetin eşdeğeri olarak da en yüksek flavonoid içeriğine yine taze labada yaprağının su ekstraktının (17.70±0,55 mg QUE/g) sahip olduğu bulundu.

Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinin tayininde BHA, BHT, askorbik asit ve EDTA standartları kullanıldı. 250 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek şelatma aktivitesine EDTA (68.00±0,67) ve taze labada yaprağının su ekstraktının (60.50±0,11) sahip olduğu tespit edilmiştir.

DPPH• radikali giderme aktivitesinin tayininde BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit standartları kullanılmıştır. 100 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek radikal giderme aktivitesine BHA (37.50±0,18) ve taze labada yaprağının su ekstraktının (25.10±0,35) sahip olduğu belirlenmiştir. EC_{50} değerleri arasında en yüksek değere α-tokoferol (18.26±0,33 µg/ml), en düşük değere ise taze labada yaprağının su ekstraktının (8.46±0,75 µg/ml) sahip olduğu belirlenmiştir.

H_2O_2 giderme aktivitesinin tayininde BHT, BHA, askorbik asit, α-tokoferol standartları kullanıldı. 50 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek H_2O_2 giderme aktivitesine BHT (83.96±0,03) ve taze labada yaprağının su ekstraktının (60.00±0,43) sahip olduğu bulunmuştur.

Toplam ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) indirgeme kapasitesinin tayininde standart olarak BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit kullanıldı. 100 µg/mL konsantrasyonda en yüksek Fe^{+3} iyonlarını indirgeme kapasitesine askorbik asit (0.137±0,021) ve taze labada yaprağının metanol ekstraktının (0.079±0,007) sahip olduğu tespit edilmiştir.

Süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesinin tayininde BHA, BHT ve askorbik asit standartları kullanıldı. 150 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek süperoksit anyon radikalini giderme aktivitesini askorbik asit (28.60±0,30) ve taze labada yaprağının su ekstraktı (28.00±0,31) göstermiştir.

ABTS•+ radikali giderme aktivitesi tayininde standart olarak BHA, BHT, α-tokoferol ve askorbik asit kullanıldı. 200 µg/mL konsantrasyonda en yüksek ABTS•+ radikali giderme aktivitesine α-tokoferol (64.40±0,194) ve kuru labada yaprağının su ekstraktının (60.40±0,68) sahip olduğu belirlenmiştir. EC_{50} değerleri arasında en yüksek değere BHA'nın (15.34±0,75 µg/mL), en düşük değere ise kuru labada yaprağının su ekstraktının (10.12±0,50 µg/mL) sahip olduğu belirlenmiştir.

Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde askorbik asit standart olarak kullanıldı ve askorbik asit standart grafiği y=0,0029x+0,0008 olarak bulundu. En yüksek antioksidan aktivitesi α-tokoferol ve taze labada yaprağının su ekstraktında 24.14 mg askorbik asit/g olduğu tespit edilmiştir.

Hidroksil radikali giderme aktivitesi tayininde BHT standart olarak kullanıldı. 250 µg/mL konsantrasyonda BHT'nin hidroksil radikali giderme aktivitesinin 62.50±0,03 olduğu bulundu. Labada yaprağı ekstraktları arasından da taze labada yaprağının su ekstraktı 39.80±0,24 ile en yüksek radikal giderme aktivitesini göstermiştir.

Bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli tayininde askorbik asit standart olarak kullanıldı. 100 µg/mL konsantrasyonda en yüksek potansiyele askorbik asit (0.498±0,098) ve taze labada yaprağının su ekstraktının (0.425±0,168) sahip olduğu belirlenmiştir. EC_{50} değerlerinin askorbik asit için 0.367±0,090 µg/mL, taze labada yaprağının su ekstraktı için 0.145±0,055 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

Ferrik tiyosiyanat metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde standartlar BHA, BHT, askorbik asit ve α-tokoferol'dür. 50 µg/mL konsantrasyon için en yüksek toplam antioksidan aktiviteye α-tokoferol (71.89±0,47) ve kuru labada yaprağı metanol ekstraktının (80.96±0,71) sahip olduğu belirlendi. 100 µg/mL konsantrasyon için en yüksek toplam antioksidan aktiviteye α-tokoferol (75.20±0,61) ve kuru labada yaprağı metanol ekstraktının (79.80±0,67) sahip olduğu tespit edildi. 150 µg/mL konsantrasyonda en yüksek toplam antioksidan aktiviteye α-tokoferol (76.48±0,63) ve kuru labada yaprağının metanol ekstraktının (83.56±0,39) sahip olduğu bulundu. 200 µg/mL konsantrasyon için en yüksek toplam antioksidan aktivite α-tokoferol (76.07±0,74) ve kuru labada yaprağı metanol ekstraktında (83.36±0,72) gözlemlendi. 250 µg/mL konsantrasyon için en yüksek toplam antioksidan aktiviteye α-tokoferol (74.68±0,54) ve kuru labada yaprağı metanol ekstraktının (83.81±0,50) sahip olduğu tespit edildi.

Klorofil a miktarı 12.93 mg/kg yaş ağırlık, klorofil b miktarı 4.56 mg/kg yaş ağırlık ve toplam klorofil miktarı 17.49 mg/kg yaş ağırlık olarak bulunmuştur.

Toplam karotenoid içeriği kuru ağırlık başına % toplam karotenoid miktarı hesaplanarak %10.82 olarak belirlendi.

LC-MS/MS ile taze labada yaprağı ekstraktının fenolik madde tayininde standart olarak absisik asit, kafeik asit, kateşin, epikateşin, etilgallat, gallik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, gibberallik asit, kamferol, jasmonik asit, kumarin, naringin, *p*-kumarik asit, propil gallat, protokatekuik asit, kuersetin, salisilik asit, siringik asit, trans ferrulik asit, rutin, 2-hidroksi trans sinnamik asit, ellagic asit, mirisetin, GSH ve GSSG kullanılmıştır. Taze labada yaprağı ekstraktlarında bulunan fenolik maddeler; gallik asit, protokatekuik asit, 2,5-dihidroksi benzoik asit, kafeik asit, salisilik asit, siringic asit, trans ferrulik asit, rutin, *p*-kumarik asit, kuersetin, absisik asit, jasmonik asit, GSH ve GSSG'dir. Taze labada yaprağı ekstraktında rutin (12087,0758 µg/kg) en yüksek konsantrasyona, salisilik asit ise en düşük konsantrasyona (17,2674 µg/kg) sahiptir.

ÖZET

Labada (*Rumex patientia* L.) yaprağının taze ve kurutulmuş örneklerinin metanol ve su ekstraktları hazırlanarak serbest radikalleri giderme ve antioksidan aktiviteleri farklı metotlarla incelendi.

En yüksek toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid içeriği ve Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesini taze labada yaprağının su ekstraktı göstermiştir.

DPPH• radikali giderme akvitesinin tayininde, standartlara en yakın aktiviteyi taze labada yaprağının su ekstraktı (28.90±0,67) göstermiştir. H_2O_2 giderme aktivitesinin tayininde, en yüksek H_2O_2 giderme oranı taze labada yaprağının su ekstraktında belirlendi. Toplam ferrik (Fe^{+3}) iyonlarını indirgeme kapasitesi tayininde, labada ekstraktlarının indirgeme kapasiteleri arasında taze-metanol>kuru-metanol>taze-su>kuru-su sıralaması gözlemlendi. Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayininde, en yüksek radikal giderme aktivitesini taze labada yaprağının su ekstraktı gösterdi.

$ABTS^{\bullet+}$ radikali giderme aktivitesinin tayininde, kuru labada yaprağının su ekstraktı (60.40±0,68) diğer labada yaprağı ekstraktlarından daha yüksek oranda radikal giderme aktivitesi gösterdi. Fosfomolibden metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde, taze labada yaprağının su ekstraktının daha yüksek aktiviteye sahip olduğu anlaşıldı.

Klorofil içeriğinin belirlenmesinde, toplam klorofil miktarı (17.49 mg/kg) yaş ağırlık cinsinden incelendi. Karotenoid içeriğinin tayininde, kuru ağırlığın mg'ı başına düşen % toplam karotenoid içeriği (%10.82) tespit edildi.

Hidroksil radikali giderme aktivitesini en yüksek taze labada yaprağının su ekstraktı gösterdi. Bakır iyonlarını indirgeme potansiyelinin tayininde, taze labada yaprağının su ekstraktı en yüksek indirgeme potansiyelini gösterdi.

Linoleik asit sisteminde ferrik tiyosiyanat (FTC) metodu ile toplam antioksidan aktivite tayininde, en yüksek aktiviteyi kuru labada yaprağı metanol ekstraktının (83.81±0,50) gösterdiği tespit edildi.

LC-MS/MS ile fenolik madde analizinde, en yüksek konsantrasyonun rutinde (12087,0758 μg/kg), en düşük konsantrasyonun ise salisilik asitte (17,2674 μg/kg) olduğu gözlemlendi.

Labada (*Rumex patientia* L.) bitkisinin taze ve kuru örneklerinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktivite gösterdiği ve taze labada yaprağının sentetik antioksidanlara alternatif olabilecek doğal bir antioksidan kaynağı olabileceğinin sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Labada, *Rumex patientia* L., antioksidan aktivite, DPPH•, fenolik bileşik, demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi.

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL PROFILE OF DOCK (*Rumex patientia* L.) EXTRACTS BY *IN VITRO* METHODS

SUMMARY

The antioxidant activities of fresh and dried samples of (*Rumex patientia* L.) plant were by preparing methanol and water extracts, free radicals were examined by different methods.

The highest total phenolic compound, total flavonoid content and iron (II) ions chelating showed the water extracts of the fresh dock.

In the determination of DPPH• radical scavenging activity, the nearest activity to the standards showed the water extract of the fresh dock. In the H_2O_2 scavenging activity assay, the highest H_2O_2 removal rate was determined in the fresh extract of water.

In the determination of total ferric ions (Fe^{3+}) reduction capacity, fresh-methanol>dry-methanol>fresh-water>dry-water sequence was observed among the reduction capacities of extracts in the dock. In the determination of superoxide anion radical scavenging activity, the highest radical scavenging activity showed fresh extracts of water.

In the determination of ABTS•+ radical scavenging activity, the water extract of the dry dock showed a higher rate of radical removal than the extracts of the other dock. The total antioxidant activity was determined by the phosphomolybdenum method, it was found that fresh water extract had higher.

In determining chlorophyll content, total chlorophyll content (17.49 mg/kg) was examined in terms of wet weight. Total carotenoid content per mg of dry weight (%10.82) was determined in determination of carotenoid content. In determining the hydroxyl radical

scavenging activity showed the highest of fresh water extract. In the determination of the reduction potential of copper ions, the fresh water extract showed the highest reduction potential.

Determination of the total antioxidant capacity by the ferric thiocyanate method in linoleic acid sytem, the highest activity was determined by the methanol extract (%83.81±0,50) in the dry dock. In the analysis of phenolic material by LC-MS/MS, the highest concentration was observed in routine (12087,0758 μg/kg) and the lowest concentration in salicylic acid (17,2674 μg/kg).

It was concluded that methanol and water extracts obtained from fresh and dry samples of dock (*Rumex patientia* L.) plant have antioxidant activity and fresh dock could be a natural antioxidant source that can be an alternative to synthetic antioxidants.

Key words: Dock, *Rumex patientia* L., antioxidant activity, DPPH•, phenolic compound, chelating activity of iron (II) ions.

KAYNAKLAR

1- Fang Y, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 2002;872-879.

2- Bektaşoğlu B. Hidroksil Radikal Süpürülmesine Dayalı Antioksidan Aktivite Ölçümünde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi (tez). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2007.

3- Gülçin İ, Oktay M, Küfrevioğlu İ, Aslan A. Determination of antioxidant activity of Lichen Cetraria İslandica L. Ach. Journal of Ethnopharmacology 2002;325-329.

4- Machlin L, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. The Faseb Journal 1987.

5- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.

6- Cheesman K H, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulltin 1993;49(3):481-493.

7- Gutteridge S, McEwen C. Analysis of inhibition of the ergosterol pathway in fungi using the Atmospheric Solids Analysis Probe (ASAP) Method. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2007;1274-1278.

8- Choe E, Min D. B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. Food Science Nutrition 2006;46:1-22.

9- Hallıwell B, Gutterıdge J. Free radicals in biology and medicine. 3rd Ed., Oxford University Press 1999.

10- Valko M, Leıbfrıtz D, Moncol J, Cronın D, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007;39:44-84.
11- Nakazawa T, Anderson P, Kiessling R. Hydrogen peroxide secreted by tumor- derived macrophages down- modulates signal- transducing zeta molecules and inhibits tumor- specific T cell- and natural killer cell- mediated cytotoxicity. European Journal of Immunology 1996.
12- Antmen E. Oxidative stress at Beta talasamide. Cukurova Uni. Pub 2005;12:20-4
13- Cos S, Emilio S, Barcelo S. Melatonin and mammary pathological Growth. Frontiersin Neuroendocrinology 2000;133-170.
14- Sımon H. U, Haj-yehıa A, Levı-schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in the apoptosis induction. Apoptosis 2000;5:415-418.
15- Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiologhy 1949;24:1-15.
16- Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G. Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. Clin. Chem. 1991;37(11):1932-1937.
17- Larson RA. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 1998;27(4):969-978.
18- Naczk M, Shahidi F.C. Extraction and analysis of phenolics in food. Review Journal of Chromatography A 2004;1054:95-111.
19- Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2006;3:30-39.
20- Nogueira C, Zenı G, Rocha, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds. Toxicology and Pharmacology Chemical Reviews 2004;104:6255-6285.
21- Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 1996;27(1):41-50.
22- Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygencentered free radicals. Brazilian J. Med. Biol. Res. 1993;26:1141-1155.
23- Peterson J, Dwyer J. Flavonoids, Dietary occurence and biochemical activity. Nutrition Research 1998;18:1995-2018.
24- Bajpai VK, Baek KH, Kang SC. Antioxidant and free radical scavenging activites of taxoquinane, a diterpenoid isolated from Metasequoia glyptostrobaides. South African Journal of Botany 2017;111:93-98.

25- Streyer L. Biochemistry. New York: 4 th Ed., W. H. Freeman and Company, 1995.
26- Çavdar C, Sifil A, Çamsar T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1997;3-4:92-95.
27- Soriani M, Pietraforte D, Minetti M. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: Role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. Archieves of Biochemistry and Biophysics 1994; 312: 180-188.
28- Seçkin T. İşlevsel Bitki Kimyası. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, 2014.
29- Baytop T. Medicinal and poisonus plants of Turkey. Akgün Press University of Istanbul 1963;315.
30- Davıs P. H. Flora of Turkey and East Aegean Islands. Edinburgh University Press 1967;281-293.
31- Başkan S, Özdemir A, Günaydın K, Erim B. Analysis of anthraquinones in Rumex crispus by micellar electrokinetic chromatography. Talanta 2007;71:747-750.
32- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture 1977;28:49-55.
33- Zhıshen J, Mengcheng T, Jıanmıng W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 1999;64:555-559.
34- Oyaizu M. Studies on product of browing reaction prepared from glucose amine. Japan Journal of Nutrition 1986;44:307-315.
35- Q.Blois MS. Antioxidant determinatios by the use of stable free radical. Nature 1958;11:991-200.
36- Ruch RJ, Cheng SJ, Klauning JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular comunication by antioxidant catechins isolated from Chmese green tea. Carcinogenesis 1989;10(6):1003-1008.
37- Yogi K, Nishimiki M, Rao NA. The accurance of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochemical and Biophysical Research Communications 1972;46(2):849-854.
38- Yong M, Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pamola A. Antioxidants activity applying an improved ABTS radical cation decolarization assay. Free Radical Biology and Medicine 1999;26:1231-1237

39- Prieto P, Inedo M, Aguliar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: spesific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 1999;269:337-341.

40- Quantick P, Alasalvar C, Farsi M, Wiktorowicz R. Effect of chill storage and modified atmosphere pacaking (MAP) on antioxidant activity, antocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready to eat shredded orange and purole carrots. Food Chemistry 2005;89:69-76.

41- Cardenas A, Gamez M, Frontona C. Electrochemical method to quantify antioxidant emplaying Cupric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC. Procedio Chemistry 2014;12:62-65.

42- Mitsuda H, Yasumato K, Iwami K. Antioxidative action of indole compounds during the antioxidation of lineleoic acid. Eiyoto Shokuryo 1966;19:210-214

43- Terpinc P, Cigic B, Polak T, Hribar J, Pazri T. LC-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. Food Chemistry 2016;210:9-17.

44- Şat İ, Öz Ö. Haşlama ve kurutmanın bazı sebzelerin bileşimi üzerine etkisi. Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi 2015;3:54-62.

45- Ay M, Yavaşoğlu M. Tere (Lepidium Sativum L.) bitkisi özütlerinin antioksidan kapasitelerinin ve enzim inhibisyon etkilerinin belirlenmesi. 2017;BP-TR-017.

46- Bunea A, Andjelkovic M, Socaciu C, Bobis O, Neacsu M, Verhe R and Camp. JV. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh. refrigerated and processed Spinach (Spinacia oleracea L.). Food Chemistry 2008;108:649–656.

47- Yanardağ R, Kahraman S. Labada (Rumex cristatus DC)'nın Antioksidan Aktivitesi (tez). İstanbul; İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2009.

48- Güngören M, Saydam S, Karataş F. Farklı yörelerdeki yabani semizotu (Portulaca Oleracea L.) ile kültür ortamında yetiştirilmiş semizotunun in vitro antioksidatif kapasitesinin belirlenmesi. Fırat Univ. Journal of Science 2017;29(2):15-22.

49- Lone I. A, Kaur G, Athar M, Alam S. Protective effect of Rumex patientia (English spinach), roots on ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced hepatic oxidative stress and tumor promotion response. Food and Chemical Toxicology 2007;45:1821-1829.

50- Yıldırım A, Mavi A, Kara A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. Extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001;49: 4083-4089.

51- Demir Y, Demir N, Nadaroğlu H. Kapari (Capparis Spinosa) bitkisinin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. 10. Gıda Kongresi Özet Bildirisi, Erzurum, 2008.

52- Türkoğlu S, Çelik S, Keser S. Morus alba' nın meyve ve yaprak ekstrelerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2014.

53- Yeşiloğlu Y, Gülen S. Asma ve Yonca Yapraklarının in vitro Antioksidan Özellikleri (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2013.

54- Mantle D, Eddeb F, Pıckering T. Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. Journal of Ethnopharmacology 2000;72:47-51.

55- Yeşiloğlu Y, Engin B. Mürver ve Karalahana Çiçeklerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2018.

56- Yıldıztekin M, Tuna A. Farklı ekim sisteminde yetiştirilen yonca (Medicago sativa L.) bitkisinin bor alımı yönünden değerlendirilmesi. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 2015.

57- Başak S, Candan, F. Lallemantia canescens (L) Fisch & Mey bitkisinin ve kallus doku kültürünün antioksidan aktivitesi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2008;6-1.

58- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Çelik E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. Microchimica Acta 2009;160:413–419.

59- Karagözler A, Yavaşer, R. Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması (tez). Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2011.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Solunumsal patlama ile serbest radikal oluşumu…… 4
Şekil 2. Hücrede serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar……..5
Şekil 3. α-tokoferolün yapısı…… 7
Şekil 4. Askorbik asidin yapısı…… 8
Şekil 5. Melatonin yapısı……. 8
Şekil 6. Lipoik asidin dihidrolipoik aside indirgenme reaksiyonu……. 8
Şekil 7. C_6-C_3-C_6 sistemi ve flavonoidlerin genel yapısı…… 9
Şekil 8. Ürik asit yapısı…… 9
Şekil 9. Bilirubin yapısı…….. 9
Şekil 10. β-karoten yapısı……. 10
Şekil 11. Likopen yapısı…… 10
Şekil 12. Glutatyon yapısı……. 10
Şekil 13. Labada (*Rumex patientia* L.) yaprağı……. 12
Şekil 14. Gallik asit standart grafiği…….. 28
Şekil 15. Pirokateşol standart grafiği……. 29
Şekil 16. Labada ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri cinsinden fenolik madde içerikleri.. 30
Şekil 17. Labada ekstraktlarının pirokateşol eşdeğeri cinsinden fenolik madde içerikleri.30
Şekil 18. Gallik asit standart grafiği…….. 31
Şekil 19. Kuersetin standart grafiği…….. 32
Şekil 20. Labada ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri.. 32
Şekil 21. Labada ekstraklarının kuersetin eşdeğeri olarak flavonoid madde içerikleri… 33
Şekil 22. Labada ekstraktlarının metal iyonlarını şelatlama aktiviteleri……. 34
Şekil 23. Labada ekstraktlarının DPPH• radikali giderme aktiviteleri……. 35

Şekil 24. Labada ekstraktları ve standartların H_20_2 giderme aktiviteleri……..... 37
Şekil 25. Labada ekstraktları ve standartların Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme kapasiteleri…. 39
Şekil 26. Labada ekstraktları ve standartların süperoksit anyon radikali giderme aktiviteleri……. 40
Şekil 27. Labada ekstraktları ve standartların $ABTS^{\bullet+}$ radikali giderme aktiviteleri…. 42
Şekil 28. Askorbik asit standart grafiği…… 44
Şekil 29. Labada ekstraktları ve α-tokoferolün toplam antioksidan aktiviteleri…….. 45
Şekil 30. Labada ekstraktları ve BHT standartının hidroksil radikali giderme aktivitesi. 46
Şekil 31. Askorbik asit ve ekstraktların bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli ……. 47
Şekil 32. Labada ekstraktları ve standatlarının 50 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonun zamanla değişimi…… 49
Şekil 33. Labada ekstraktları ve standartların 50 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri……..... 49
Şekil 34. Labada ekstraktları ve standatlarının 100 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonun zamanla değişimi…… 50
Şekil 35. Labada ekstraktları ve standartların 100 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri……. 51
Şekil 36. Labada ekstraktları ve standatlarının 150 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonun zamanla değişimi…… 52
Şekil 37. Labada ekstraktları ve standartların 150 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri……. 52
Şekil 38. Labada ekstraktları ve standatlarının 200 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonun zamanla değişimi…… 53
Şekil 39. Labada ekstraktları ve standartların 200 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri……. 54
Şekil 40. Labada ekstraktları ve standatlarının 250 µg/mL konsantrasyonlarında linoleik asit peroksidasyonun zamanla değişimi……... 55
Şekil 41. Labada ekstraktları ve standartların 250 µg/mL konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri…… 55
Şekil 42. Labada yaprağının klorofil miktarları…… 56
Şekil 43. Labada bitkisinin toplam karotenoid içeriği……. 57
Şekil 44. Taze labada ekstraktının gallik asit spektrumu……. 58
Şekil 45. Taze labada ekstraktının protokatekuik asit spektrumu…… 58

Şekil 46. Taze labada ekstraktının 2,5-dihidroksibenzoik asit spektrumu…….. 58
Şekil 47. Taze labada ekstraktının kafeik asit spektrumu…… 59
Şekil 48. Taze labada ekstraktının salisilik asit spektrumu……. 59
Şekil 49. Taze labada ekstraktının siringik asit spektrumu…… 59
Şekil 50. Taze labada ekstraktının trans ferrulik asit spektrumu…… 60
Şekil 51. Taze labada ekstraktının rutin spektrumu……... 60
Şekil 52. Taze labada ekstraktının p-koumarik asit spektrumu…… 60
Şekil 53. Taze labada ekstraktının kuersetin spektrumu…….. 61
Şekil 54. Taze labada ekstraktının absisik asit spektrumu……. 61
Şekil 55. Taze labada ekstraktının jasmonik asit spektrumu……. 61
Şekil 56. Taze labada ekstraktının GSH spektrumu……. 62
Şekil 57. Taze labada ekstraktının GSSG spektrumu…….. 62

TABLOLAR

Tablo 1. Serbest radikal türleri……. 3
Tablo 2. Taze labadanın ekstrakt verimleri……. 27
Tablo 3. Kuru labadanın ekstrakt verimleri……. 28
Tablo 4. Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin metal şelatlama kapasiteleri…… 34
Tablo 5. DPPH• radikali giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin radikal giderme aktiviteleri……... 36
Tablo 6. DPPH• radikali verilerinden ekstraktların hesaplanan EC_{50} değerleri…….. 36
Tablo 7. DPPH• radikali verilerinden standartların hesaplanan EC_{50} değerleri……. 37
Tablo 8. H_2O_2 giderme aktivitesinde kullanılan standart çözeltilerin radikal giderme aktiviteleri…… 38
Tablo 9. Standart çözeltilerinin Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri……. 39
Tablo 10. Standart çözeltilerinin süperoksit anyon radikali giderme aktiviteleri…… 41
Tablo 11. Standart çözeltilerinin $ABTS^{\bullet+}$ radikali giderme aktiviteleri……. 42
Tablo 12. $ABTS^{\bullet+}$ radikali verilerinden ekstraktların hesaplanan EC_{50} değerleri…… 43
Tablo 13. $ABTS^{\bullet+}$ radikali verilerinden standartların hesaplanan EC_{50} değerleri…… 43
Tablo 14. Ekstraktların bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli sonuçlarından hesaplanan EC_{50} değerleri…… 48

Tablo 15. Askorbik asit standartının bakır iyonlarını indirgeme potansiyeli sonuçlarından hesaplanan EC_{50} değerleri…… 48
Tablo 16. Taze labada ekstraktında bulunan fenolik maddeler ve konsantrasyonları…. 57
Tablo 17. Taze labada da bulunan fenolik bileşiklerin alıkonma süreleri ve m/z değerleri ……... 63

ÖZGEÇMİŞ



8 Ağustos 1993 tarihinde Kırklareli' de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Babaeski İlköğretim Okulu'nda tamamladım. 2011 yılında Babaeski Lisesi Fen Bilimleri programından mezun oldum ve aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım. 2011-2012 yılları arasında Namık Kemal Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu'nda İngilizce hazırlık eğitimi aldım. Lisans öğrenimim sırasında 30 iş günü olan zorunlu stajımı Zentiva Sağlık Ürünleri Sanayi ve Tic. A.Ş.'de yaptım. 2016 yılında kimya lisans eğitimimi bölüm birincisi olarak tamamladım. 2016 güz yarıyılı döneminde Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Anabilimdalı yüksek lisans programına başladım. Seleda Biyogaz Enerji Sanayi ve Tic. A.Ş.'de kimyager olarak çalışıyorum.